

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Jana FERDIN

**PRIMERJAVA DVEH METOD VERIŽNE REAKCIJE S
POLIMERAZO ZA DOKAZ BORELIJ LYMSKE BORELIOZE**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**COMPARISON OF TWO DIFFERENT POLYMERASE CHAIN
REACTION METHODS FOR BORRELIA DETECTION**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2007

Diplomsko delo je zaključek dodiplomskega univerzitetnega študija mikrobiologije. Raziskovalno delo je bilo opravljeno na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, in sicer v Laboratoriju za diagnostiko borelioz in leptospiroz.

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je na seji dne 16. junija 2006 odobrila temo diplomske naloga in za mentorico imenovala doc. dr. Evo Ružič-Sabljić, dr. med. in za recenzentko prof. dr. Katjo Seme, dr. med.

Mentor: doc. dr. Eva Ružič-Sabljić

Recenzentka: prof.dr. Katja Seme

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja Žgur-Bertok, univ. dipl. biol.

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: doc. dr. Eva Ružič-Sabljić, dr. med.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: prof. dr. Katja Seme, dr. med.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Jana Ferdin

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK UDK 579.25: 577.212: 595.4: 616.993(043)=863
KG Bakterije/*Borrelia burgdorferi* sensu lato/lymska borelioza/PCR/vgnezdena PCR/
PCR v realnem času/*ospA* gen/flagelin/5S–23S/restrikcija PCR-pridelka/*MseI*
AV FERDIN, Jana
SA RUŽIČ-SABLJIČ, Eva (mentorica) / SEME, Katja (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija
mikrobiologije
LI 2007
IN PRIMERJAVA DVEH METOD VERIŽNE REAKCIJE S POLIMERAZO ZA
DOKAZ BORELIJ LYMSKE BORELIOZE
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XII, 75 str., 23 pregl., 12 sl., 1 pril., 108 vir.
IJ SI
JI sl/en
AI Lymška borelioza je zoonoza, ki jo na severni polobli prenašajo klopi. V Sloveniji je kot prenašalec povzročiteljice bolezni, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, najbolj razširjen *Ixodes ricinus*. V sklopu kompleksa *B. burgdorferi* sensu lato bolezen najpogosteje povzročajo *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. Namen naše naloge je bil po izolaciji DNA iz 135 vzorcev bolnikov primerjati dve različici molekularnega dokazovanja prisotnosti borelijske okužbe. Uspešnost izolacije smo ugotavljali s pomnoževanjem treh različnih tarčnih sekvenc (gen *ospA*, gen za flagelin in medgenski odsek 5S-23S). Vsako izmed tarč smo pomnoževali z drugačnimi začetnimi oligonukleotidi. Primerjali smo dva različna protokola vgnezdene PCR s protokolom PCR v realnem času. Največji delež (25,2 %) pozitivnih vzorcev smo določili z enostopenjsko vgnezdeno PCR z določevanjem medgenskega odseka 5S-23S. V 20,0 % vzorcev smo zaznali flagelinsko sekvenco s PCR v realnem času, v najmanjšem številu (14,1 %) pa je bil z dvostopenjsko vgnezdeno PCR dokazan gen *ospA*. Za najustreznejšo sekvenco se je pokazala borelijsko značilna 5S-23S, med različicami PCR pa se je za bolj praktično in uporabno izkazal PCR v realnem času. Po skladnosti rezultatov sta si najbližje dvostopenjska vgnezdena PCR in PCR v realnem času (86,7 %), najmanj pa (26,0 %) enostopenjska vgnezdena PCR in PCR v realnem času. Borelijska DNA je bila največkrat dokazana v kolenskem punknatu in koži. V kužninah smo z restrikcijo PCR-pridelkov po enostopenjski vgnezdenu PCR v večini določili *B. afzelii* (29,4 %), nato *B. garinii* (14,7 %), velikokrat celo prisotnost obeh skupaj (14,7 %). Ugotovili smo, da pomnoževanje različnih tarčnih genov DNA vpliva na rezultat, kar je še vedno odraz nestandardiziranosti tehnike direktnega dokazovanja.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDK 579.25: 577.212: 595.4: 616.993(043)=863
CX bacterias/*Borrelia burgdorferi* sensu lato/lyme borreliosis/PCR/nested PCR/
real – time PCR/OspA gen /flagellin/5S–23S/ PCR-product restriction / *MseI*
AU FERDIN, Jana
AA RUŽIČ-SABLJIČ, Eva (supervisor) / SEME, Katja (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in
Microbiology
PY 2007
TI COMPARISON OF TWO DIFFERENT POLYMERASE CHAIN REACTION
METHODS FOR BORRELIA DETECTION
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XII, 75 p., 23 tab., 12 fig., 1 ann.,108 ref.
LA SI
AL sl/en
AB Lyme borreliosis is tick-transmitted disease in the northern-hemisphere. In Slovenia the main vector of the causative agent, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, is *Ixodes ricinus* tick. Within the complex *B. burgdorferi* sensu lato there are three main species: *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii* and *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. The aim of our study was to make a comparison of two different PCR approaches for detection of borrelial infection. In the study we included 135 samples, that were collected for molecular testing. First we performed DNA isolation with QIAamp set of reagent. DNA extraction was verified by amplification of three different target sequences (*ospA* gene, *flagellin* gene and intergenic region 5S-23S). Every target was amplified with different primers. Comparison was made between »nested« PCR (one and two tubes) and real-time PCR. The largest part of PCR products was detected amplifying intergenic region 5S-23S with one-tube »nested« PCR, followed by real-time PCR with detection of *flagellin* gene and two-tube »nested« PCR with *ospA* gene (25.2 %, 20.0 % and 14.1 %, respectively). Our result demonstrated that the most appropriate sequence for detection of *B. burgdorferi* sensu lato was intergenic spacer 5S-23S, while for the most useful and practical technique was chosen real-time PCR. When attention was paid to accordance between techniques it was shown 86.7 % between two-tube »nested« PCR and real-time PCR and only 26,0 % between one-tube »nested« PCR and real-time PCR. DNA of *B. burgdorferi* sensu lato was in most cases detected in samples of skin and knee-punctures. After one-tube »nested« PCR *MseI* restriction was applied. Analysis of the restriction polymorphism of the PCR product indicated presence of *B. afzelii* and *B. garinii*, either one or two species (29.4 %, 14.7 %, 14.7 %, respectively). We found out that amplification of different target DNA gene influence on final result. That is consequence of lacking standardization by performing direct detection of causative agent.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	IX
KAZALO SLIK	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
1 UVOD	1
1.1 CILJI RAZISKOVANJA	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 EPIDEMIOLOGIJA IN GEOGRAFSKA RAZŠIRJENOST LYMSKE BORELIOZE	3
2.2 <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato - POVZROČITELJICA LYMSKE BORELIOZE	4
2.2.1 Taksonomija borelij	4
2.2.2 Struktura borelijske celice.....	6
2.2.3 Borelijski antigeni.....	8
2.2.4 Fiziologija borelij in genska eksperesija v gostitelju in prenašalcu.....	10
2.2.5 Genom.....	11
2.2.5.1 Genetska organizacija.....	11
2.2.5.2 Kromosom	12
2.2.5.3 Plazmidi	14
2.3 PRENAŠALCI BORELIJ LYMSKE BORELIOZE.....	15
2.3.1 Geografska razširjenost klopov <i>Ixodes</i> po svetu.....	15
2.3.2 Življenski krog klopa	16
2.3.3 Potek infekcije in razvoj borelij v klopu	17
2.4 ŽIVALSKI REZERVOAR <i>B. burgdorferi</i> sensu lato.....	18
2.5 LYMSKA BORELIOZA.....	19
2.5.1 Klinični znaki bolezni.....	19

2.5.2	Imunski odziv	21
2.5.3	Diagnoza lymške borelioze	22
2.5.3.1	Serološko dokazovanje lymške borelioze.....	22
2.5.3.2	Izolacija in kultiviranje bakterije.....	23
2.5.3.3	Verižna reakcija s polimerazo	23
2.5.3.3.1	Izbira tarčnega mesta	25
2.5.3.3.2	Izbira oligonukleotidnih začetnikov	25
2.5.3.3.3	Vgnezdena PCR.....	25
2.5.3.3.4	PCR v realnem času.....	26
2.5.3.3.5	Prednosti in slabosti PCR.....	28
2.5.3.3.6	Dokazovanje PCR-pridelkov	29
2.5.4	Zdravljenje lymške borelioze	30
2.5.5	Preventivna zaščita pred okužbo	30
3	MATERIALI IN METODE	32
3.1	MATERIAL	32
3.1.1	Humani vzorci.....	32
3.1.2	Kulture bakterij <i>B. burgdorferi</i> sensu lato	32
3.2	METODE	33
3.2.1	Izolacija DNA iz humanih vzorcev	33
3.2.2	Vgnezdena PCR.....	34
3.2.2.1	Verižno pomnoževanje gena <i>OspA</i>	34
3.2.2.2	Verižno pomnoževanje medgenske regije <i>rrf-rrl</i>	36
3.2.3	Analiza PCR – pridelkov dobljenih z vgnezdeno PCR	37
3.2.4	Encimska restrikcija PCR-pridelkov (medgenske regije <i>rrf-rrl</i>) z endonukleazo <i>MseI</i>	38
3.2.4.1	Priprava poliakrilamidnega gela za prikaz restrikcije PCR-pridelkov	38
3.2.4.2	Priprava restrikcijske mešanice za rezanje z endonukleazo	39
3.2.5	Analiza fragmentov po rezanju na vertikalnem poliakrilamidnem gelu	39

3.2.5.1	Tipiziranje <i>B. burgdorferi</i> sensu lato po končani analizi razrezanih PCR-pridelkov	40
3.2.6	Pomnoževanje dela gena za flagelin <i>B. burgdorferi</i> sensu lato v realnem času.....	41
3.2.6.1	Princip detekcije pomnoženih PCR-pridelkov s sistemom LightCycler.....	43
3.2.6.2	Analiza rezultatov po pomnoževanju flagelinske sekvence s PCR v realnem času	43
3.2.6.3	Priprava reagentov za PCR reakcijsko mešanico v realnem času	43
4	REZULTATI.....	45
4.1	DOLOČANJE <i>B. burgdorferi</i> sensu lato V HUMANIH VZORCIH S POMNOŽEVANJEM IN DOKAZOM GENA ZA OspA Z DVOSTOPENJSKO RAZLIČICO VGNEZDENE PCR.....	45
4.2	DOLOČANJE <i>B. burgdorferi</i> sensu lato V HUMANIH VZORCIH S POMNOŽEVANJEM IN DOKAZOM MEDGENSKEGA ODSEKA 5S-23S (rrf-rrl) Z ENOSTOPENJSKO RAZLIČICO VGNEZDENE PCR.....	47
4.2.1	Encimska restrikcija PCR-pridelkov medgenskega odseka 5S-23S (rrf-rrl) <i>B. burgdorferi</i> sensu lato, dobljenih z enostopenjsko različico vgnezdene PCR	48
4.3	DOLOČANJE DELA GENA ZA FLAGELIN <i>B. burgdorferi</i> sensu lato V HUMANIH VZORCIH S POMNOŽEVANJEM IN DOKAZOM V REALNEM ČASU	50
4.4	PRIMERJAVA SKLADNOSTI REZULTATOV MED POSAMEZNIMI RAZLIČICAMI PCR	51
4.5	PRIMERJAVA SKLADNOSTI REZULTATOV VSEH TREH RAZLIČIC PCR ZA POMNOŽEVANJE DNA <i>B. burgdorferi</i> sensu lato	53
4.6	TRAJANJE VSEH TREH RAZLIČIC PCR OD POSTOPKA IZOLACIJE DNA <i>B. burgdorferi</i> sensu lato DO KONČNEGA REZULTATA	54
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	55
5.1	RAZPRAVA.....	55

5.2 SKLEPI.....	61
6 POVZETEK.....	62
7 VIRI	64

ZAHVALA

PRILOGA

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1:	Vrste borelij in njihova geografska razširjenost (Stanek in Strle, 2003: 1640; Richter in sod., 2004).	5
Preglednica 2:	Glavni klinični znaki lymške borelioze v posameznih obdobjih bolezni (Strle, 2006: 49).	21
Preglednica 3:	Koncentracije in volumni reagentov za reakcijsko mešanico vgnezdenega pomnoževanja gena za <i>OspaA</i> bakterije <i>B. burgdorferi</i> sensu lato.	35
Preglednica 4:	Sekvence začetnih oligonukleotidov gena za <i>OspA</i> (v smeri 5' → 3'), genska pozicija, mesto vezave na genu in velikost PCR-pridelka (Zore in sod., 2002: 607).	36
Preglednica 5:	Zaporedja začetnih oligonukleotidov medgenskega odseka <i>rrf-rrl</i> (v smeri 5' → 3'), genska pozicija, mesto vezave na genu ter velikost PCR-pridelka (Postic in sod., 2000: 240).	36
Preglednica 6:	Koncentracije in volumni reagentov za reakcijsko mešanico vgnezdenega pomnoževanja medgenskega odseka <i>5S-23S</i> (<i>rrf-rrl</i>) <i>B. burgdorferi</i> sensu lato.	37
Preglednica 7:	Volumni reagentov za pripravo poliakrilamidnih gelov (za 2 gela).....	39
Preglednica 8:	Volumni, začetne in končne koncentracije reagentov za pripravo restriksijske mešanice z endonukleazo <i>MseI</i>	39
Preglednica 9:	Prikaz polimorfizma v velikosti fragmentov različnih borelijjskih vrst po rezanju PCR-pridelka z endonukleazo <i>MseI</i> (Wang in sod., 1999: 638).	40
Preglednica 10:	Volumni, začetne in končne koncentracije reagentov za pripravo PCR reakcijske mešanice za pomnoževanje v realnem času.	42
Preglednica 11:	Priprava univerzalne sonde in oligonukleotidnih začetnikov iz še nerazredčene raztopine reagentov.	44

Preglednica 13:	Vrsta in število kužnin uporabljenih za dokazovanje prisotnosti borelijske DNA.....	45
Preglednica 14:	Rezultati po opravljenem pomnoževanju gena za <i>OspA B. burgdorferi</i> sensu lato z dvostopenjsko vgnezdno PCR v različnih vrstah vzorcev.	46
Preglednica 15:	Rezultati po opravljenem pomnoževanju medgenskega odseka 5S-23S (rrf-rrl) <i>B. burgdorferi</i> sensu lato z enostopenjsko vgnezdno PCR v različnih vrstah vzorcev.....	48
Preglednica 16:	Vrste določene po restrikciji medgenskih odsekov 5S-23S (rrf-rrl) <i>B. burgdorferi</i> sensu lato po končanem pomnoževanju z enostopenjsko vgnezdno PCR.	49
Preglednica 17:	Rezultati po pomnoževanju dela gena za flagelin <i>B. burgdorferi</i> sensu lato v realnem času v različnih vrstah vzorcev.....	51
Preglednica 18:	Skladnost enostopenjske in dvostopenjske vgnezdene PCR za dokazovanje DNA <i>B. burgdorferi</i> sensu lato.	51
Preglednica 19:	Skladnost pomnoževanja s PCR v realnem času in z dvostopenjsko vgnezdno PCR za dokazovanje DNA <i>B. burgdorferi</i> sensu lato.	52
Preglednica 20:	Skladnost pomnoževanja s PCR v realnem času in z enostopenjsko vgnezdno PCR za dokazovanje DNA <i>B. burgdorferi</i> sensu lato.	52
Preglednica 21:	Ujemanja in neujemanja rezultatov vseh treh različic PCR za dokazovanje DNA <i>B. burgdorferi</i> sensu lato.	53
Preglednica 22:	Kombinacije dobljenih rezultatov s vsemi tremi različicami PCR za dokazovanje DNA <i>B. burgdorferi</i> sensu lato.	54
Preglednica 23:	Čas potreben za postopke od začetka izolacije DNA <i>B. burgdorferi</i> sensu lato do dobljenega končnega rezultata.....	54

KAZALO SLIK

Slika 1:	Taksonomska razvrstitev spirohet (Pasteur in sod., 1991).....	4
Slika 2:	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato v temnem polju (Richard, 2005).....	6
Slika 3:	Značilna struktura spirohet (a) in povečava njenega prečnega preseka (b) (Lyme disease, 2005)	8
Slika 4:	Organizacija ribosomskih genov <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato (Postic, 2000: 240).....	13
Slika 5:	Razvojne oblike klopa <i>Ixodes ricinus</i> (od leve proti desni: ličinka, nimfa, odrasel klop) (Schachterle, 2004).....	16
Slika 6:	Razvojni krog klopa <i>Ixodes ricinus</i> (Schachterle, 2004).....	17
Slika 7:	Nastanek fluorescentnega signala sonde TaqMan pri metodi PCR v realnem času (Nucleo acid research facilities, 2007)	28
Slika 8:	Prikaz polimorfizma restrikcijskih fragmentov po rezanju z endonukleazo <i>MseI</i> (Postic in sod., 1996: 242).....	41
Slika 10:	Dokazovanje 560 bp velikega odseka gena za beljakovino OspA po končanem PCR pri 19 naključnih vzorcih, treh negativnih in dveh pozitivnih kontrolah..	46
Slika 11:	Dokazovanje 226 - 256 bp velikega odseka 5S-23S po končanem pomnoževanju pri 19 vzorcih, treh negativnih in dveh pozitivnih kontrolah....	47
Slika 12:	Vzorci encimske razgradnje medgenskega odseka 5S-23S z endonukleazo <i>MseI</i> pri 10 vzorcih enostopenjske vgnezdene PCR	48

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Ag	antigen
APS	amonijev persulfat
bp	bazni par
BSA	goveji serumski albumin (angl. bovine serum albumin)
BSK	močno obogateno gojišče za kultivacijo borelij (okrajšava za Barbour, Sitenner, Kelly)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. deoxyribonucleic acid)
dNTP	deoksinukleotidtrifosfat (angl. deoxynucleotid triphosphate)
ds DNA	dvovijačna DNA (angl. double strand deoxyribonucleic acid)
E	enota katalitske aktivnosti encima; količina encima, ki pretvori 1 μ mol substrata v produkte v 1 minuti
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina (angl. ethylenediaminetetraacetic acid)
ELISA	encimsko imunski test
EM	erythema migrans
ext	zunanj (angl. external)
IFT	imunofluorescentni test
int	notranji (angl. internal)
MKP	spremenjeno Kellyjevo gojišče za kultivacijo borelij (angl. Modified Kelly Medium)
vgnezdena PCR	verižna reakcija s polimerazo z notranjimi začetnimi oligonukleotidi
Osp A	zunanj protein na površini (angl. outer surface protein A)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction)
RFLP	raznolikost dolžine fragmentov po restrikciji z encimom (angl. restriction fragment length polymorphism)
rRNA	ribosomska ribonukleinska kislina
ss DNA	enovijačna DNA (angl. single strand deoxyribonucleic acid)
TAE	Tris baza/Acetat/EDTA
TBE	Tris/Borate/EDTA
TEMED	N, N, N', N' Tetramethylethylene diamine

1 UVOD

V sredini 1970-ih so v ameriškem mestu Lyme države Connecticut poročali o nenavadno velikem številu revmatoidnih artritsov pri otrocih in mladostnikih (Steere in sod., 1977). Podrobno raziskovanje tega pojava je pripeljalo do odkritja povzročitelja (spiroheta *Borrelia burgdorferi*) in njegovega prenašalca (klop *Ixodes scapularis*). Bakterijo je 1982 prvi uspešno izoliral Willy Burgdorfer, šele dve leti kasneje (1984) so spiroheto dokončno identificirali, uvrstili v rod in jo poimenovali po njenem odkritelju (Steere, 1989).

Lymška borelioza je najpogostejša bolezen, ki jo prenešajo klopi na severni polobli Zemlje (Stanek in Strle, 2003). Med države, v katerih je njena prisotnost endemična, uvrščajo tudi Slovenijo (Strle in sod., 1995a). Prisotnost bolezni je omejena na predele, kjer na istem območju živijo okužene živali in njihovi zajedalci. V Evropi znani prenašalci borelij iz ene živalske vrste na drugo so trdoščitasti klopi rodu *Ixodes ricinus* (Stanek in Strle, 2003; Zore in sod., 2006). V krogu prenosa je človek le naključni gostitelj (Barbour, 1998).

Povzročiteljica bolezni je spiralna bakterija znotraj kompleksa *Borrelia burgdorferi* sensu lato (lat. v širokem pomenu) družine *Spirochaetaceae* (Paster in sod., 1991). Človeku nevarne so vrste *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii* in *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (lat. v ozkem pomenu) (Ružič-Sabljić, 2006). Naravni in v Sloveniji najpogostejši rezervoar bakterije sta voluharica in rumenogrla miš (Zore in sod., 1999 in 2006; Ružič-Sabljić, 2002).

Potek bolezni je raznolik, lahko tudi brez simptomov (Sood, 1999; Strle, 2000). Po vbođu klopa se najpogosteje razvije kožna sprememba erythema migrans, ki je sama po sebi dovolj značilen pokazatelj okužbe, vendar potrebuje laboratorijske potrditve. Ostale klinične znake, ki so značilni za lymško boreliozo, je potrebno potrditi z razpoložljivimi diagnostičnimi pristopi (Stanek in Strle, 2003). V vsakdanji rabi so to serološke metode, kultivacija in izolacija povzročitelja, vedno bolj se uveljavlja tudi molekularna diagnostika (Wilske in sod., 2007). Zdravljenje je učinkovitejše v zgodnjih fazah, a ostaja pravilo, da je vedno bolje preprečiti kot zdraviti (Strle, 1999c; Stanek in Strle, 2003).

1.1 CILJI RAZISKOVANJA

- Oceniti učinkovitost pomnoževanja *B. burgdorferi* sensu lato v kliničnih vzorcih s tremi različicami PCR: enostopenjska vgnezdena PCR, dvostopenjska vgnezdena PCR in PCR v realnem času;
- Ugotoviti, katera izmed izbranih tarčnih zaporedij je najustreznejša za dokazovanje DNA borelij lymške borelioze;
- Določiti občutljivost preiskovanih metod in ugotoviti katera je bolj uporabna v vsakdanjem delu (eno/dvostopenjska vgnezdena PCR ali PCR v realnem času);
- Ugotoviti v kateri kužnini najpogosteje dokažemo prisotnost DNA *B. burgdorferi* sensu lato;
- Določiti, katera vrsta kompleksa *B. burgdorferi* sensu lato je najpogostejša in v katerih vrstah kužnin;

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Predvidevamo upešno izolacijo borelijske DNA s komercialnim kompletom;
- Predpostavljamo uspešno pomnoževanje različnih tarčnih odsekov DNA v genomu borelij;
- Predvidevamo, da bosta vgnezdena PCR in PCR v realnem času enako učinkoviti;
- Predpostavljamo, da bo DNA *B. burgdorferi* sensu lato najpogosteje zaznana v bioptičnih vzorcih kože, najredkeje pa v telesnih tekočinah (kri, likvor, urin);

2 PREGLED OBJAV

Lymska borelioza je ime za skupino raznolikih bolezenskih stanj. Prvo klinično poročilo te oblike bolezni je bilo zabeleženo v začetku 20. stoletja v Evropi, ko sta leta 1909 Šved A. Afzelius in leta 1913 B. Lipschutz z Dunaja poročala o kožni spremembi erythema migrans (Belaich, 1995). Sprva so bolezen poimenovali lymski artritis. V tem obdobju sta leta 1982 raziskovalca Burgdorferi in Barbour izolirala takrat neznano spiralno bakterijo iz klopov *Ixodes dammini* (sedaj *Ixodes scapularis*) in o njej prvič poročala (Steere, 1989). Vse to je sprožilo začetek velikega števila sledečih raziskav na področju genetike in taksonomije povzročitelja, preiskave gostiteljev in prenašalcev bakterije, fiziopatologije bolezni, kliničnih metod diagnostike in razvoja na področju izdelave cepiva (Postic in sod., 2000). Pozneje so bakterijo izolirali iz kože, likvorja in krvi bolnikov (Aguero-Rosenfeld, 2005). V Sloveniji so kožno spremembo erythema migrans poznali že pred več kot 40 leti, vendar ji niso posvečali veliko pozornosti. Leta 1981 je erythema migrans prvič opisal J. Lesničar (Ružič-Sabljić, 2002).

2.1 EPIDEMIOLOGIJA IN GEOGRAFSKA RAZŠIRJENOST LYMSKE BORELIOZE

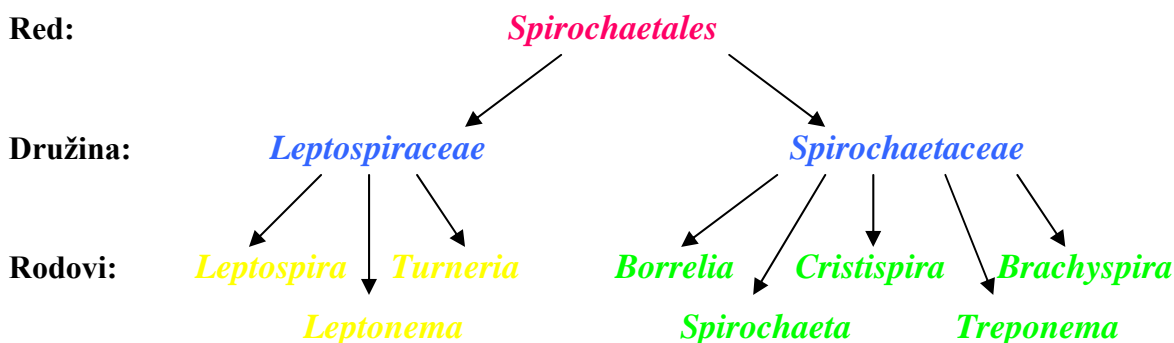
Lymska borelioza je na severni zemeljski polobli najpogostejša bolezen, ki jo prenašajo klopi (Stanek in Strle, 2003). Najpogosteje o njej poročajo v severni Ameriki in Evropi, kjer je pojavnost v določenih državah endemična. O posamičnih primerih poročajo iz območja Azije (Kitajske, Japonske), Avstralije (Steere, 1989) in daljnega vzhoda Rusije (Wang in sod., 1999; Aguro-Rosenfeld, 2005). Slovenija je ena redkih držav članic Evropske unije, kjer je prijava bolnika z lymsko boreliozo obvezna. Incidenca lymske borelioze se je v zadnjih nekaj letih v Sloveniji povzpela na 150/100.000 prebivalcev in še vedno narašča. Število obolenj je po poročanjih podobno kot v ZDA (Strle in sod., 1995a). Incidenca bolezni se po svetu razlikuje, saj nanjo vpliva gostota klopov, živalski rezervoar za *B. burgdorferi* sensu lato, življenjsko okolje in način življenja (Barbour, 1998; Steere, 2000). Bolezen je sezonska, zanjo pa zbolevalo ženske in moški vseh starosti, še posebno tisti, ki so poklicno, lokalno ali kako drugače bolje izpostavljeni klopom (Strle in sod., 1995a).

Razširjenost lymske borelioze se pokriva s področji razširjenosti klopov. Takšna območja se razlikujejo po vrstah prisotnih klopov in borelij, ki jih ti prenašajo. Prenasajo jih trdi ščitasti klopi *Ixodes*, ki so prisotni v celotnem zmernem pasu severne poloble (Wang in sod., 1999; Postic in sod., 2000; Ružič-Sabljić in sod., 2002). Predvsem v Evropi je to vrsta klopa *I. ricinus*, v ZDA pa sta vektorja klopa *I. pacificus* in *I. scapularis* (Eisen, 2002).

2.2 *Borrelia burgdorferi* sensu lato - POVZROČITELJICA LYMSKE BORELIOZE

2.2.1 Taksonomija borelij

Sprva je identifikacija spirohet potekala na podlagi preučevanja značilnosti njihove strukture in gibanja z mikroskopiranjem v temnem polju. Kasneje je analiza 16S rRNA (*rrs* regije) spirohete znotraj reda *Spirochaetales* razdelila v dve različni družini, kot prikazuje slika 1. To sta *Leptospiraceae* in *Spirochaetaceae*. V družini *Leptospiraceae* imajo svoje mesto rodovi *Leptospira*, *Leptonema* in *Turneria*, medtem ko družino *Spirochaetaceae* sestavljajo rodovi *Borrelia*, *Cristispira*, *Brachyspira* (nekoč *Serpulina*), *Spirochaeta* in rod *Treponema* (Paster in sod., 1991; Holt in sod., 1994). V rodu *Borrelia* do sedaj poznamo že več kot 20 vrst. Borelijske vrste v grobem razdelimo glede na bolezen, ki jo povzročajo. Ločimo skupino, ki povzroča bolezen povratno mrzlico in skupino, ki povzroča lymsko boreliozo (Barbour in Hayes, 1986). Posebnost borelij je, da so redka bakterijska skupina, pri katerih se filogenetska povezanost kaže s fenotipskimi lastnostmi.



Slika 1: Taksonomska razvrstitev spirohet (Paster in sod., 1991).

Lymsko boreliozo povzročajo spirohete (borelije), ki jih skupno imenujemo *Borrelia burgdorferi* sensu lato (Paster in sod., 1991; Holt in sod., 1994; Wang in sod., 1999). V preteklih letih so domnevali, da je *B. burgdorferi* edina vrsta, ki je odgovorna za različne simptome lymske borelioze. Kmalu je postalo jasno, da med vrstami borelij obstaja velika heterogenost, in to ne samo tistih, izoliranih pri človeku, temveč tudi pri klopih (Postic in sod., 2000). Metode molekularne biologije so omogočile natančnejšo analizo borelijskih vrst in njihovo razdelitev (Wang in sod., 1999). Tako so do danes na osnovi homologije molekule DNA opredelili 12 borelijskih vrst, ki jih prenašajo trdi ščitasti klopi. Med njimi je šest vrst načeloma patogenih za človeka (pogosto *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia afzelii* in *Borrelia garinii*; redkeje *Borrelia spielmanii*, *Borrelia lusitaniae* in *Borrelia bissettii*), preostalih šest so dokazali le pri klopih in zanje ni potrjeno, da bi povzročale okužbo pri človeku (*Borrelia japonica*, *Borrelia tanukii*, *Borrelia turdi*, *Borrelia andersonii*, *Borrelia sinica*, *Borrelia valaisiana*) (Ružič-Sabljić, 2006).

Preglednica 1 prikazuje katere od 12 borelijskih vrst kompleksa *B. burgdorferi* sensu lato so bile identificirane v različnih predelih sveta. V severni Ameriki so bile prepoznane tri vrste, šest so jih identificirali v Evropi, sedem vrst pa je uspelo prepoznati znanstvenikom v azijskih državah (Kitajska, Japonska in Koreja) (Richter in sod., 2004; Agüero-Rosenfeld in sod., 2005).

Preglednica 1: Vrste borelij in njihova geografska razširjenost (Stanek in Strle, 2003: 1640; Richter in sod., 2004).

Vrsta	regija
<i>B. afzelii</i>	Evropa in ponekod v Aziji
<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto	severna Amerika in Evropa
<i>B. garinii</i>	Evropa in ponekod v Aziji
<i>B. bissettii</i>	severna Amerika in Slovenija*
<i>B. andersoni</i>	severna Amerika
<i>B. japonica</i>	Japonska
<i>B. lusitaniae</i>	Večinoma na Portugalskem, Tunizija
<i>B. sinica</i>	Kitajska
<i>B. tanuki</i>	Japonska
<i>B. turdii</i>	Japonska
<i>B. valaisiana</i>	Osrednja Evropa, Irska, Velika Britanija
<i>B. spielmani</i> sp. nov	Osrednja Evropa

**B. bissettii* izoliran le iz enega pacienta z različnimi znaki, ki sumijo na lymsko boreliozo

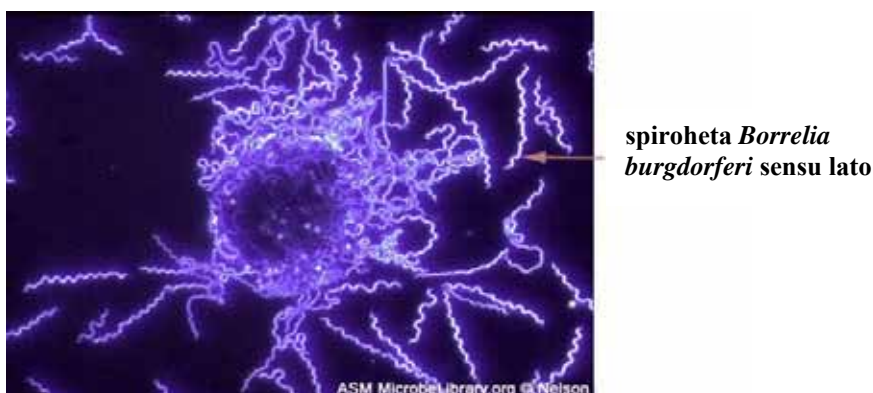
V Evropi so ugotovili, da so človeku nevarne najmanj tri vrste znotraj kompleksa *B. burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii* in *B. garinii*), v ZDA je znana le *B. burgdorferi* sensu stricto, na območju Azije pa je bila nevarnost za ljudi potrjena le pri *B. afzelii* in *B. garinii* (Mathiesen, 1997; Wang in sod., 1999; Richter in sod., 2004; Agüero-Rosenfeld in sod., 2005).

Vsaka od človeku nevarnih vrst očitno preferira določen organski sistem (van Dam in sod., 1993). Tako domnevajo, da so različne vrste povezane z različnimi kliničnimi znaki lymške borelioze (Wang in sod., 1999). Pri bolnikih s spremembami na koži so pogosto izolirali *B. afzelii* (Picken in sod., 1997; Picken in sod., 1998; Ružić-Sabljić in sod., 2002), *B. garinii* naj bi največkrat povzročala okvare živčevja, *B. burgdorferi* sensu stricto pa spremembe sklepov (Cimmino in sod., 1998; Nadelman in Wormser, 1998; Humair in Gern, 2000; Strle, 2006).

2.2.2 Struktura borelijske celice

Borelije imajo z ostalimi spirohetami skupno helikalno obliko telesa, gibanje, sestavo zunanje celične membrane, ki obkroža kompleks proteoplazmičnega cilindra (citoplazma, notranja celična membrana in peptidoglikan), in strukturo (Barbour in Hayes, 1986).

Borelije so po Gramu negativne vrste, ki slovijo po svoji tanki, raztegnjeni zunanosti (slika 2) (Barbour in Hayes, 1986).



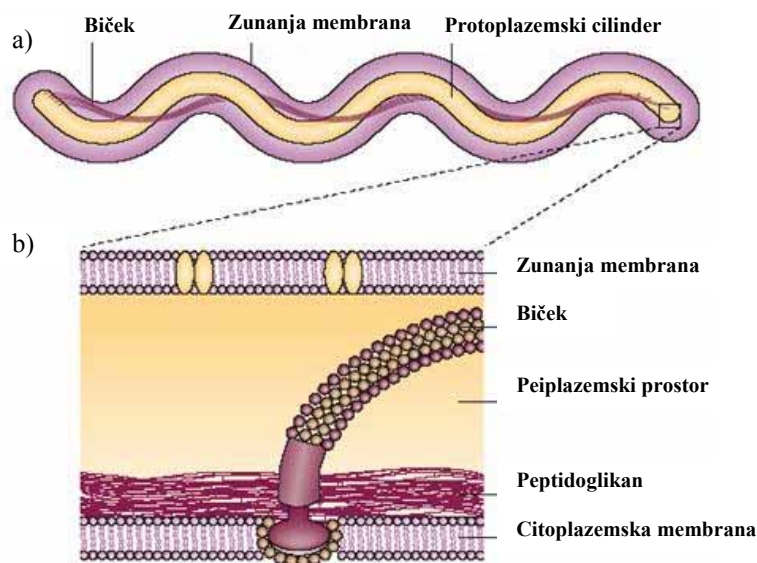
Slika 2: *Borrelia burgdorferi* sensu lato v temnem polju (Richard, 2005).

Širina celic dosega 0,2-0,5 μm . Njihova dolžina se giblje od 8 do 30 μm in je odvisna od starosti kulture ter okolja, v katerem se spiroheta nahaja (gojišče, gostitelj) (Barbour in Hayes, 1986; Fernández in sod., 1997; Ružič-Sabljić, 2006). Celice spirohet so obdane z zunanjo membrano kar prikazuje slika 3. Na zunanjo celično membrano bakterij je šibko pritrjena plast amorfne sluzi, za katero se ne ve, ali je pridobljena od gostitelja, v katerem se nahaja, ali je komponenta medija ali snov mogoče proizvaja bakterija sama (Barbour in Hayes, 1986).

Značilno obliko in gibljivost jim dajejo bički, ki se po sestavi ne razlikujejo od evbakterijskih. Od njih se razlikujejo le po lokaciji bička, ki ni na površini, temveč v periplazemskem prostoru med zunanjo in citoplazemsko membrano (slika 3). Segajo od enega do drugega pola in se na sredini celice prekrivajo. Posamezne borelije imajo od sedem do enajst bičkov, ki jim omogočajo gibanje na tri različne načine: obračanje, svedrasto zavijanje ali upogibanje na mestu (Barbour in Hayes, 1986; Charon in sod., 1992; Fernández in sod., 1997; Ružič-Sabljić E., 2006). Notranja razporeditev bičkov jim omogoča gibljivost v viskozni medijih, kar jim daje prednost pred drugimi bakterijami (Barbour and Hayes, 1986).

Zunanja membrana je struktura, ki obdaja periplazemski prostor z bički, peptidoglikanom in protoplazemskim cilindrom (Barbour in Hayes, 1986; Radolf, 1994). Je troplastna, zelo fluidna in krhka. Sestavljena je iz beljakovin znotraj membrane, beljakovin na površini membrane (angl. *outer surface protein*; Osp) in iz lipopolisaharida (LPS). LPS je podoben kot pri Gramu negativnih bakterijah, le da vsebuje več beljakovin in manj endotoksičnih lipopolisaharidov (Olsen in sod., 1999; Stanek in Strle, 2003; Ružič-Sabljić, 2006). Znano je, da je zunanja membrana spirohet dovzetnejša za poškodbe s strani detergentov in fizikalnih sprememb (centrifugiranje in spiranje). Večino membrane sestavljajo proteini (45-62%) in lipidi (32-50%), le majhen delež sestave pokrivajo ogljikovi hidrati (3-4%) (Barbour in Hayes, 1986; Radolf, 1994).

V notranjosti bakterije je protoplazemski cilindri, ki ga obdaja citoplazemska membrana iz fosfolipidnega dvosloja. Vsebuje genom bakterije, ribosome in mezosomske komponente (Barbour in Hayes, 1986; Fernández in sod., 1997).



Slika 3: Značilna struktura spirohet (a) in povečava njenega prečnega preseka (b) (Lyme disease, 2005)

Žive borelije najlažje opazujemo z mikroskopiranjem v temnem polju ali fazno kontrastnim mikroskopom, saj je značilno, da se slabše barvanjo po Gramu (Barbour in Hayes, 1986).

2.2.3 Borelijski antigeni

Leta 1994 je Bledstonu in sodelavcem uspelo uspešno preučiti sestavo notranje in zunanje borelijske membrane. S tem so ugotovili, da posamezen sev *B. burgdorferi* sensu lato skupno vsebuje vsaj 30 različnih beljakovin, velikih od 15 do 110 kD. Po vrsti in količini izraženih beljakovin (beljakovinskem profilu) lahko med seboj razlikujemo seve borelij. Približno polovica teh beljakovin ima na svoji površini antigenske lastnosti, ki pri okuženih osebah sprožijo nastajanje specifičnih protiteles (Wilske in sod., 1988; Ružič-Sabljič, 2006). Membranski proteini so potrebni za vzdrževanje membranske strukture, nekateri od njih sodelujejo pri encimskih reakcijah in drugi pri transportu. Najbolj raziskanih je šest in jih označujemo z OspA - OspF (Wilske in sod., 1988; Ružič-Sabljič, 2006). Med glavne površinske beljakovine uvrščamo OspA (30,5-33 kD), OspB (34-36 kD) in OspC (20-25 kD) (Fernández in sod., 1997). Zapisi za Osp beljakovine se nahajajo na linearnih in cirkularnih plazmidih.

Zapis za OspA beljakovino se nahaja na 57 kb velikem linearnem plazmidu. Pri skoraj vseh izolatih *B. burgdorferi* sensu lato najdemo OspA, ki se med vrstami razlikuje po velikosti (Wang in sod., 1999). Wilske in njegovi sodelavci (1993) ter kasneje Wang s sodelavci (1999) so na osnovi monoklonskih protiteles določili osem različnih serotipov OspA beljakovine (Wilske in sod., 1993; Fernández in sod., 1997; Wang in sod., 1999). Ti serotipi so različno razporejeni med klopnimi in humanimi izolati in so po vsej verjetnosti tudi razlog različnih kliničnih izražanj lysmske borelioze (Wang in sod., 1999). Uporabljali so ga tako za antigen pri serološki diagnostiki kot tudi pri razvoju izdelave cepiva. V oprijemljivost bakterije je verjetno tako kot OspA vključena tudi beljakovina OspB. Zapis za beljakovino OspB se nahaja na istem plazmidu kot za OspA (Xu in sod., 1996). Zanimivo je, da se redkeje izraža pri vrsti *B. garinii* (Fernández in sod., 1997).

Prevladujoč antigen, ki sproži nastanek specifičnih protiteles v zgodnjih fazi infekcije z *B. burgdorferi* sensu lato, je protein OspC. Njegova molekulska masa variira med 20 in 25 kD (Wang in sod., 1999). Zapis zanj je lociran na 27 kb krožnem plazmidu. Našli so ga pri vseh izolatih *B. burgdorferi* sensu lato, vendar se pri vseh ne prepisuje aktivno (Fernández in sod., 1997). Beljakovina je poznana kot pomemben virulenčni dejavnik, ki bakteriji omogoča vstop v gostiteljske celice in njihovo infekcijo (Masuzawa in sod., 1994; Lagal, 2003). Pričetek njenega poglobitnega izražanja se prične z aktivnim hranjenjem klopa. OspC antigen bakteriji predstavlja izstopnico za pobeg iz klopovega črevesja v njegove žleze slinavke (Kurtenbach in sod., 2002, Fingerle in sod., 2002). Očitno je gen *ospC* pomemben za širjenje borelij, saj se njegovo izražanje nadaljuje tudi v vretenčarskih gostiteljih (Fingerle in sod., 2002).

Med manj izrazite beljakovine borelijske zunanje površine spadajo OspD, OspE in OspF. Produkt gena *ospD*, ki je lociran na linearnem plazmidu borelijskih vrst, je domnevni virulenčni faktor v kompleksu *B. burgdorferi* sensu lato velikosti 30 kD. Gena niso našli pri vseh spirohetah lysmske borelioze. OspE in OspF sta beljakovini pod nadzorom istega promotorja, po velikosti pa se razlikujeta, in sicer meri prva 19kD, druga pa 26 kD (posamično) (Fernández in sod., 1997). Tudi ta dva proteina si skupaj delita mesto zapisa na linearnem plazmidu (Xu in sod., 1996).

Zelo močan antigen, ki običajno prvi sproži nastajanje protiteles, je flagelin. Je osnovna beljakovina borelijskih bičkov z molekulska masa 41 kD. Zapis zanj je shranjen na kromosomu (Fraser in sod., 1997), njegovi odseki flagelina pa imajo podobno ali celo identično strukturo s flagelinom drugih gibljivih bakterij (npr. treponeme, enterobakterije, bacili). Antigenske strukturne podobnosti borelij z drugimi gibljivimi bakterijami (npr. stresne beljakovine, flagelinske beljakovine) so možen vzrok navzkrižnih reaktivnosti pri serološkem testiranju (Barbour in Hayes, 1986; Wilske in sod., 1988; Ružič-Sabljić, 2006).

Poleg opisanih beljakovin med specifične antigene za *B. burgdorferi* sensu lato uvrščamo tudi kromosomsko kodirano beljakovino v citoplazmi, ki se imenuje p83/100. Poleg nje ima specifične lastnosti tudi beljakovina p39 in p18. Borelije te beljakovine izražajo različno, njihova vloga pa še vedno ni povsem jasna (Ružič-Sabljić, 2006). Pod določenimi pogoji izražajo borelije vsaj 12 beljakovin, ki sodijo v skupino stresnih beljakovin. Nekatere med njimi povzročajo imunsko reakcijo, zaradi podobnosti z enakimi beljakovinami drugih bakterij pa tudi navzkrižne serološke reakcije (Wilske in sod., 1988, Shapiro in Gerber, 2000).

Mnogi so mnenja, da sta antigenska raznolikost borelij in spreminjanje antigenske sestave pomembna dejavnika, ki vzročno vplivata na nastanek razvoja okužbe in potek bolezni (Wilske in sod., 1988).

2.2.4 Fiziologija borelij in genska eksperesija v gostitelju in prenašalcu

Vrste, ki so jih uspeli gojiti v *in vitro* pogojih, rastejo v okolju z malo kisika (so mikroaerofilne) in so kemoorganotrofne (Holt in sod., 1994). Zanje je značilna počasna rast pri temperaturi od 30 do 37 °C. Čas delitve se giblje med 7 in 20 urami in je odvisen od prilagoditve na umetni medij (Postic in sod., 2000; Ružič-Sabljić, 2002). To je tudi razlog, zakaj je njihova kultura tako zahtevna. Rešitev uspešnega gojenja se je delno uveljavila z obogatitvijo gojišč z dodatkom zajčjega seruma, serumskega albumina in želatine. Načeloma so borelijske vrste biokemijsko neaktivne, vendar bakterija za uspešnejšo rast izrablja glukozo, poleg nje pa tudi fruktozo, maltozo, trehalozo in rafinozo (Preac-Mursic in sod., 1986; Barbour in Hayes, 1986).

Borelije so zelo prilagodljiv organizem, kar potrjuje prehajanje in preživetje bakterije v telesu prenašalcev (artropodi) in gostiteljev (vretenčarji). Gre za okolji, ki se razlikujeta po prisotnosti imunskega odziva (pri artropodih ni prisoten) in spremembi telesne temperature do 20 °C (Stanek in Strle, 2003). Spiroheta s prehodom iz prenašalca na gostitelja kot prilagoditev na spremembo okolja spremeni ekspresijo površinskih proteinov (Aguero-Rosenfeld in sod., 2005). Ugotovili so, da je kar 63 % različno izraženih genov zapisanih na plazmidih, kar poudari pomembnost plazmidnih genov za prilagajanje bakterije *B. burgdorferi* sensu lato na raznolike pogoje v okolju (Ojaimi in sod., 2003). Poznavanje genov, ki se izražajo, je pomembno tudi pri izbiri tarčnih oligonukleotidov za metodo PCR (angl. *polymerase chain reaction*) in izbiro antigenov za serološke teste. S tem lahko povečamo občutljivost in specifičnost diagnostičnih testov (Schmidt, 1997).

2.2.5 Genom

2.2.5.1 Genetska organizacija

Borelijski genom je zasnovan z linearnim kromosomom in različnim številom krožnih ter linearnih plazmidov. Genetska organizacija *B. burgdorferi* sensu lato je za prokariotske organizme izjema, zato je verjetno tudi prva bakterija, katere genom je bil v celoti sekveniran (Saint Girons in sod., 1992; Fraser in sod., 1997).

Posebnosti, ki jo ločujejo od prokariotov, so:

- linearni kromosom in več krožnih ter linearnih plazmidov v eni bakteriji (Barbour in Hayes, 1986);
- edinstvena razporeditev skupine rRNA genov;
- zapis za preko 150 lipoproteinov kodira 4,9 % genov na kromosomu in 14,5 % plazmidnih genov;
- precejšen razpad (frakcionacija) plazmidne DNA;
- številne prerazporeditve med plazmidnimi geni;
- nepoznavanje genov, ki kodirajo encime, potrebne za sintezo amino kislin, maščobnih kislin, encimskih ko-faktorjev in nukleotidov. Poleg tega *B. burgdorferi* sensu lato nima genskega zapisa za encime trikarboksilnega kislinskega cikla ali

komponent potrebnih za elektronski transport. Te ugotovitve kažejo na parazitsko naravnost mikroorganizma (Fraser in sod., 1997; Wang in sod., 1999; Casjens in sod., 2000).

Celotna velikost genoma pri tipski vrsti *B. burgdorferi* sensu stricto seva B31 je 1.521.419 bp. Največji delež njenega genoma predstavlja linearni kromosom, preostali del pa je porazdeljen med 21 ali več plazmidov (Wang in sod., 1999). Ugotovili so, da vse borelijske vrste lymške borelioze v osnovi vsebujejo linearni kromosom in dva linearna plazmida (lp54 in cp26), ki nosita približno 860 genov (Glöckner in sod., 2004).

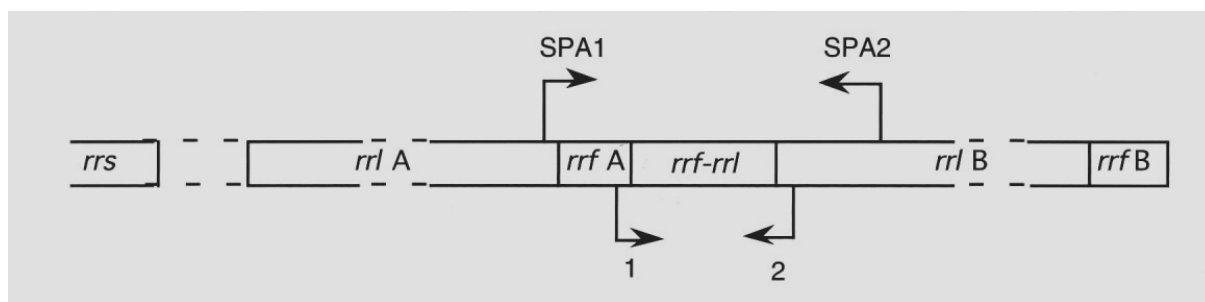
Določitev značilnosti genoma je pomembna za identifikacijo borelijske vrste. Metode za identifikacijo vrst znotraj rodu temeljijo na analiziranju kromosomskega ali plazmidnega genskega zapisa. Takšne metode so: rezanje DNA z različnimi restrikcijскими encimi, pomnoževanje genskih odsekov, hibridizacija, restrikcija ali določevanje nukleinskega zaporedja izbranemu odseku DNA (Saint Girons in sod., 1992; Wang in sod., 1999; Olsen in sod., 1999)

2.2.5.2 Kromosom

Borelijski linearni kromosom je po svoji velikosti uvrščen v skupino najmanjših znanih kromosomov pri bakterijah. Njegova velikost ne presega 1 Mb (giblje se med 935 in 958 kb). So redka bakterijska vrsta in edina med spirohetami, pri kateri so našli linearni kromosom (Hinnebusch in Barbour, 1992; Wang in sod., 1999). Pri *B. burgdorferi* sensu lato seva B31 kromosom vsebuje 853 genov, ki kodirajo osnovne strukturne proteine evbakterij, potrebne za celični cikel, rast in metabolizem (Fraser in sod., 1997).

Ena iz med lastnosti, ki *B. burgdorferi* sensu lato ločuje od običajnosti prokariontov, je njena razporeditev rRNA genov. Organizacija in prepisovanje rRNA genov je pomemben proces, ki je potreben za rast vsakega organizma. Organizacija in število rRNA genov je pomembno za razlikovanje spirohetnih rodov. V tem pogledu so borelije oddaljene od sorodnih spirohet in so si blizu z organizmoma oddaljenih vej, kot sta termofilna bakterija (*Thermus thermophilus*) in planktomiceta (*Pirellula marina*) (Olsen in sod., 1999). Splošna

organizacija borelijskega rRNA operona je sestavljena iz: promotorja, 16S (*rrs*) in dvojno ponovljenega zaporedja za 23S (*rrl*) in 5S (*rrf*) (Srivastava in Schlessinger, 1990). Razporeditev je nenavadna ravno zaradi dvojne kopije *rrl* (23S) in *rrf* (5S), ki sta tandemsko razporejeni, in le enojne kopije *rrs* (16S) (Schwartz in sod., 1992; Davidson in sod., 1992; Wang in sod., 1999). Razporeditev genov poteka po sredini linearnega kromosoma v zaporedju (slika 4): *rrs-rrlA-rrfA-rrlB-rrfB*.



Slika 4: Organizacija ribosomskih genov *Borrelia burgdorferi sensu lato* (Postic, 2000: 240; na sliki SPA 1 in SPA2 predstavljata oligonukleotidna začetnika, ki pomnožujeta zunanji odsek, številci 1 in 2 pa ponazarjata tista začetna oligonukleotida, ki pomnožujeta notranji odsek).

Z restrikcijsko analizo z encimi so raziskali tri različne odseke na tej nenavadno organizirani skupini rRNA genov: *rrs*, medgenski odsek *rrfA- rrlB* in medgenski odsek *rrs-rrlA* (Wang in sod., 1999). Medgenska regija *rrfA- rrlB* (med genoma 23S in 5S) obsega 226-266 bp. Z pomnoževanjem in encimsko restrikcijo dobljenega pridelka iz medgenskega odseka *rrfA- rrlB* so uspeli opisati osem različnih skupin znotraj kompleksa *B. burgdorferi sensu lato* (Postic in sod., 1994). Za zelo uporabno regijo se je izkazal tudi odsek *rrs-rrlA*, ki je veliko večji od regije *rrfA- rrlB*, in je vrstno specifičen merker znotraj kompleksa *B. burgdorferi sensu lato*. To medgensko razdaljo so uporabljali za tipiziranje *B. burgdorferi sensu lato* neposredno iz človeškega tkiva in klopov. Dokazali so tudi genotipsko heterogenost, kar bi lahko pomagalo pri ločevanju izolatov glede na potencial patogenosti za človeka (Wang in sod., 1999).

2.2.5.3 Plazmidi

Vrste znotraj kompleksa *B. burgdorferi* sensu lato vsebujejo povsem običajne krožne plazmide in za bakterije nenavadne dvojnovičajne linearne plazmide (Hinnebusch in Barbour, 1992). Takšno vrsto plazmida so našli pri eni od vrst *Streptomyces* (Barbour in Hayes, 1986; Saint Girons in sod., 1992). Od vseh bakterijskih vrst ravno one vsebujejo največje število plazmidov. Navadno so v prokariontskih celicah plazmidi prisotni v nizkem številu (eden do dva) glede na kromosom, pri borelijah pa to število zunajkromosomskih elementov lahko šteje tudi do 21 in več (Wang in sod. 1999; Bergstroem in sod., 2002).

Tako veliko plazmidov v sklopu genoma *B. burgdorferi* sensu lato je razdeljeno na devet krožnih in 12 linearnih plazmidov, ki skupaj predstavljajo 610.694 bp, posamično pa med 5,1 in 65 kb (Hinnebusch in Barbour, 1992; Fraser in sod., 1997; Stanek in Strle, 2003; Agüero-Rosenfeld in sod., 2005). Večina genov na plazmidih (več kot 90 %) nima prepričljive podobnosti z geni zunaj rodu *Borrelia*. Obstajajo domneve, da bakterija gene uporablja za opravljanje zanje specifičnih mehanizmov infektivnosti (Barbur in Hyes, 1986; Schwan in sod., 1988; Casjens in sod., 2000). To potrjujejo tudi spremembe antigenskih značilnosti bakterije, ki se pri prerazporeditvi plazmidnih genov spremenijo (Xu in Johnson, 1995).

Glöckner s sodelavci (2004) meni, da vse vrste *B. burgdorferi* sensu lato nimajo polnega števila plazmidov, kar pojasni razlike v velikosti genoma med izolati (Fraser in sod., 1997; Casjens in sod., 2000). Število in velikost plazmidov variirata tako med vrstami kot tudi znotraj vrst. To omogoča ločevanje sevov *B. burgdorferi* sensu lato po plazmidnem profilu (Baril in sod., 1989; Wang in sod. 1999; Bergstroem in sod., 2002).

Borelijski genom lahko prikažemo z elektroforezo v utripajočem električnem polju. S to metodo je razlikovanje borelij glede na pestrost zunajkromosomskih elementov najbolj zanesljivo, natančno, hkrati pa tudi enostavno in hitro (Postic in sod., 2000; Ružić in sod., 2002).

2.3 PRENAŠALCI BORELIJ LYMSKE BORELIOZE

Klopi so pajkovci, ki sesajo kri na živalih in tudi človeku. Različne vrste najdemo povsod po svetu in jih poznamo kot pogoste prenašalce patogenih virusov, bakterij in praživali (Logar, 1999).

Klopi so najpomembnejši prenašalci povzročitelja bolezni iz ene živalske vrste na drugo. V krogu prenosa je človek le naključni gostitelj. Na njem se s krvjo hranijo trdi ščitasti klopi *Ixodes* spp. (prenašalci borelij lymske borelioze) ali mehki usnjati klopi *Ornithodoros* spp. (prenašalci borelij povratne mrzlice). Pojavnost lymske borelioze je omejena na predelih, kjer na istem območju živijo okužene živali in njihovi zajedalci. Na severni zemeljski polobli so to trdoščitasti klopi *Ixodes*, ki so aktivnejši predvsem spomladi in jeseni. Idealen življenski prostor klopov je mešan gozd z obilno podrastjo, kjer čakajo svojega gostitelja (Tovornik, 1973; Funa in sod., 1996; Logar, 1999; Zore in sod., 2006).

Možni prenašalci *B. burgdorferi* sensu lato v naravi so tudi drugi členonožci, ki sesajo kri (Zakovska in sod., 2000). Takšen sum se oklepa komarjev (njihov pomen kot prenašalcev še ni povsem jasen) in uši.

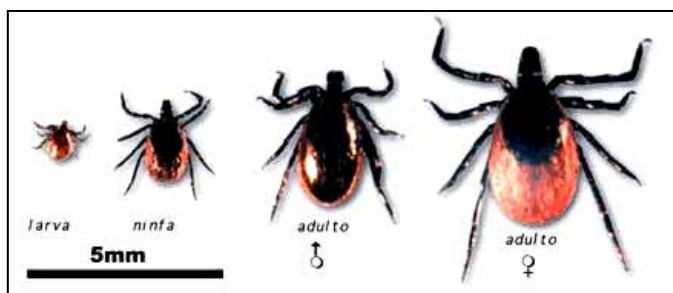
2.3.1 Geografska razširjenost klopov *Ixodes* po svetu

V Evropi so prenašalci borelij *Ixodes ricinus*, v Evraziji in nekaterih delih Azije *Ixodes persulcatus*, medtem ko na vzhodu in zahodu ZDA prevladujeta vrsti *Ixodes scapularis* in *Ixodes pacificus* (posamično). Za vrsto *Ixodes uriae* kot parazita na morskih pticah so se spraševali, če je le-ta prenašalec borelij v različne predele sveta (Stanek in Strle, 2003; Granström, 1997).

Vrsta *Ixodes ricinus* je znan kozmopolit, ki je razširjen tudi v Sloveniji. Parazitira na pticah, domačih in divjih živalih ter človeku. Poleg prenosa borelij lymske borelioze je pomemben pri širjenju virusa centralnoevropskega meningoencefalitisa (Logar, 1999)

2.3.2 Življenski krog klopa

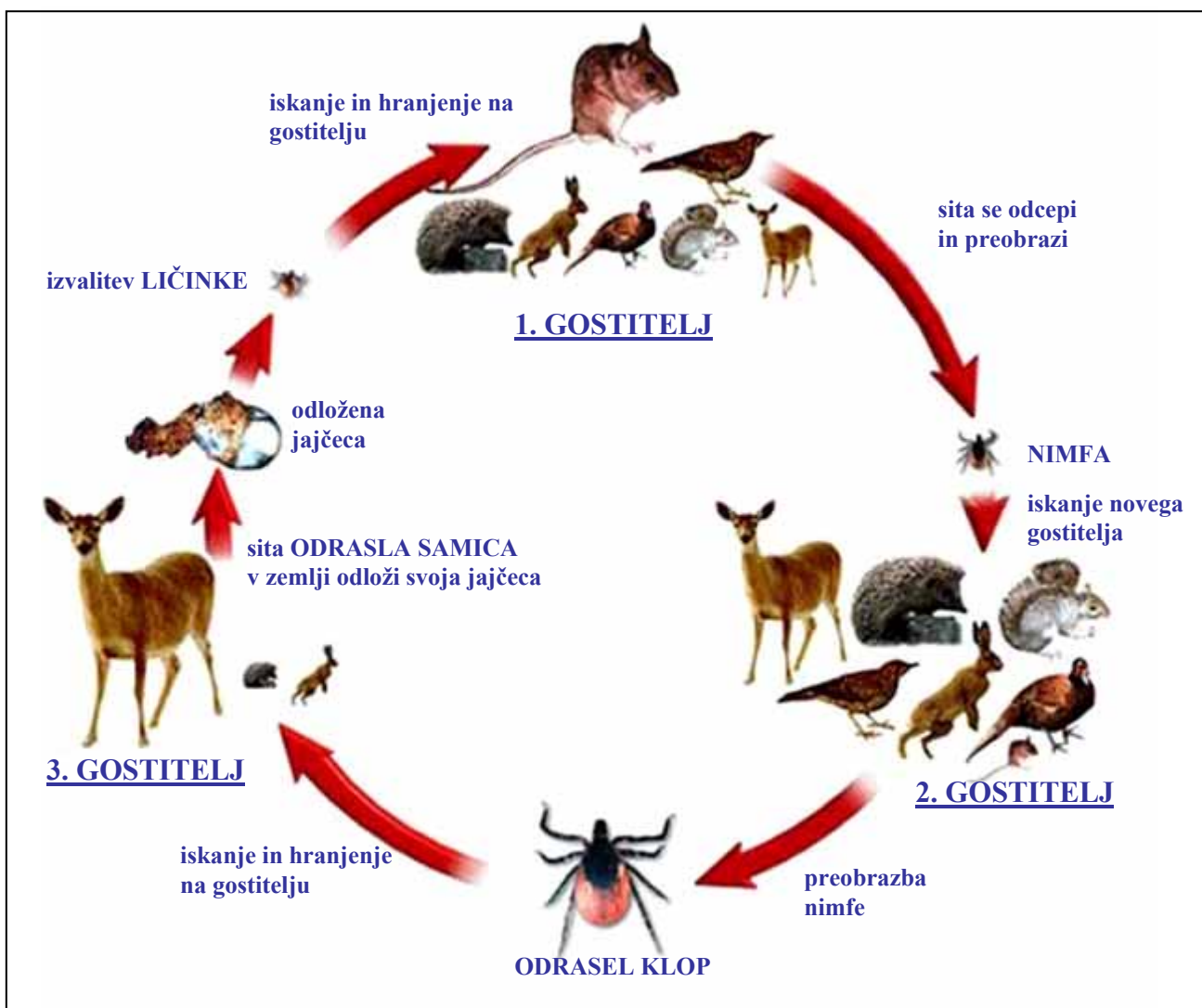
Vse vrste klopa imajo podoben življenski krog, ki običajno traja dve leti lahko pa tudi 5-6 let. Vse razvojne oblike klopa, ki jih prikazuje slika 5 (ličinka, nimfa in odrasel klop), se prehranjujejo s krvjo (Logar, 1999).



Slika 5: Razvojne oblike klopa *Ixodes ricinus* (od leve proti desni: ličinka, nimfa, odrasel klop) (Schachterle, 2004).

Začetek razvoja z jajčeci, ki jih samica odloži v zemljo, nam prikazuje slika 6. Iz njih se izležejo ličinke (larve), ki se na vretenčarskem gostitelju hranijo tri do pet dni. Ličinke nato odpadejo in se preobrazijo v nimfe. Po 3-5-dnevnem sesanju nimf na gostitelju, tudi one odpadejo in preobrazijo v višjo obliko klopa (odraslega klopa). Preobrazba se lahko zgodi na rastlinju ali velikem sesalcu. Na njem se najdlje časa (9-11 dni) hrani odrasla samica, ki življenjski krog zaključi z odlaganjem jajčec (slika 6; Stanek in sod., 1986; Logar, 1999).

Poznamo dva načina prenosa spirohet, in sicer horizontalnega in vertikalnega (transovarialni). Pri horizontalnem klop s krvjo okužene živali zaužije tudi spirohete, ki se pri naslednjem hranjenju klopa vnesejo v ranico in okužijo novega gostitelja (Gern in sod., 1993; Funa in sod., 1996). Drugi, transovarialni, način prenosa se zgodi, ko okužena samica izleže jajčeca, iz katerih se izvalijo okužene ličinke. Ko se klop enkrat okuži z borelijam, te z njim ostanejo skozi vse razvojne faze in lahko vedno okuži novega gostitelja. V naravi je večjega pomena horizontalni prenos, saj imajo okužena jajčeca manjše možnosti, da se razvijejo (Funa in sod., 1996). Do sedaj so vse študije potrdile, da so samice odraslega klopa najpogosteje okužene, manj je okuženih nimf, najmanj pa ličink (Zore in sod., 2006).

Slika 6: Razvojni krog klopa *Ixodes ricinus* (Schachterle, 2004).

2.3.3 Potek infekcije in razvoj borelij v klopu

Pred hranjenjem klopa se spirohete nahajajo v črevesju. Njihovo število je takrat za okužbo verjetno premajhno. V času hranjenja, ko borelije pridejo v stik s krvjo vretenčarja v črevesju klopa, pride do pomnoževanja spirohet, zato da dosežejo infektivno dozo. Ko se to zgodi, prebijejo črevesno steno, vstopijo v hemolimfo in se razsejejo v ostala tkiva klopa. Po tej poti jih zanese tudi v žleze slinavke, od koder jih klop skupaj s presežkom posesane krvi izloči v ugrizno ranico žrtve. Pogosto se zgodi, da klopi predčasno zapustijo gostitelja in svoje hranjenje dokončajo na novem gostitelju. Ti klopi so pred začetkom hranjenja na novem gostitelju že sistemsko okuženi in imajo borelije že prisotne v žlezah

slinavkah (Funa in sod., 1996). Po prenosu borelij iz enega bitja v drugega se v borelijah aktivirajo geni, ki jim omogočajo preživetje v novem okolju (de Silva in Fikring, 1997).

Vsak vbod klopa še ne pomeni, da bo oseba zbolela (Strle, 1991). Funa meni, da mora fizičen kontakt med gostiteljem in klopom za uspešen prenos borelij iz črevesja klopa trajati vsaj 42 ur, Sood pa je prepričan, da je za to dovolj že 24 ur (Funa in sod., 1996; Sood in sod., 1997). V kolikor so klopi že sistemsko okuženi (delno hranjeni), do prenosa borelij lahko pride že v nekaj urah (manj kot 12 ur). To potrjuje tretjina bolnikov z erythema migrans v Sloveniji, za katere ocenjujejo, da so imeli klopa pritrjenega manj kot 12 ur (Piesman in sod., 1991; Strle, 1999a). Delež takšnih bolnikov v ZDA je veliko manjše (Shapiro in Gerber, 2000).

2.4 ŽIVALSKI REZERVOAR *B. burgdorferi* sensu lato

B. burgdorferi sensu lato se v naravi giblje med prenašalci in živalskim rezervoarjem, človek je zanje le naključni in končni gostitelj (Barbour, 1998). Kompetenten rezervoar borelij so lahko le gostitelji, ki so kljub dovzetnosti za okužbe sposobni borelije vzdrževati in jim omogočiti nadaljnji prenos na klope (Wang in sod., 1999; Kurtenbach, 2002; Ružič-Sabljić, 2006).

V Sloveniji najpomembnejši živalski rezervoar borelij lymške borelioze predstavljajo mali sesalci in ptice (Barbour in Hayes, 1986; Granström, 1997; Ružič-Sabljić, 2002). Med sesalci sta najpogosteje okuženi gozdna voluharica in rumenogrla miš, pri katerih načeloma dokažemo prisotnost *B. afzelii* in *B. burgdorferi* sensu lato, le izjemoma *B. garinii* (Zore in sod., 1999 in 2006). Med učinkovite rezervoarje spadajo tudi srednje veliki sesalci, kot so podgane in veverice (Barbour in Hayes, 1986; Zore in sod., 2006). Med ptiči so kosi in njihovi sorodniki (npr. taščice, črnoglavke in galebi) rezervoar, ki je ključnega pomemena za geografsko širjenje borelij (Granström, 1997; Stanek in Strle, 2003; Zore in sod., 2006). V Evropi so ptice pogosto gostiteljice *B. garinii* in *B. valaisiana* (Stanek in Strle, 2003; Zore in sod., 2006).

Dolgo časa so srnjad in jelenjad obravnavali kot enega izmed kompetentnih rezervoarjev *B. burgdorferi* sensu lato. Do sedaj iz njih še niso uspeli izolirati borelijskih vrst, kar pomeni, da se klopi od njih niso mogli inficirati. Ugotovili so, da te živalske vrste borelij ne vzdržujejo. Tistim klopom, ki se hranijo na njih pa celo omogočijo naravno odstranitev borelij (Lane in Quistad, 1998; Jeanson, 1999).

2.5 LYMSKA BORELIOZA

V začetku 20. stoletja so v Evropi prvič opisovali nenavadne kožne spremembe, ki so v središče pozornosti prišle šele leta 1975 v ZDA, ko so pri otrocih in mladostnikih z »juvenilnim revmatoidnim artritismom« odkrili tudi prisotnost kroničnega erythema migrans. Bolezen je svoje ime dobila po mestu izbruha, Lyme, in njenem povzročitelju iz rodu *Borrelia*, ki so ga prepoznali nekaj let kasneje (Steere in sod., 1977; Burgdorfer in sod., 1982; Belaich, 1995; Ružič-Sabljić, 2002).

Lymška borelioza je okvirno ime za vrsto različnih bolezenskih stanj, ki so odraz prizadetosti številnih organskih sistemov. Povzročajo jo vse vrste znotraj kompleksa *B. burgdorferi* sensu lato, predvsem *B. afzelii*, *B. garinii* in *B. burgdorferi* sensu stricto (Steere, 1989 in 2001; Ružič-Sabljić, 2002; Stanek in Strle, 2003).

2.5.1 Klinični znaki bolezni

Bolezen ima zelo raznolik potek, ki ga delimo na zgodnje in pozno bolezensko obdobje. Zgodnje bolezensko obdobje se dalje deli še na lokalizirano in diseminirano okužbo. Bolezen se v redkih primerih izrazi v celoti. Po vvodu klopa se pogosto razvije erythema migrans, lahko sledi prizadetost srca, živčevja in tudi sklepov. Neobičajno se lahko pojavijo tudi očesne okvare, pozne nevrološke in kožne spremembe (Barbour, 1998; Steere, 1989 in 2001; Stanek in Strle, 2003). Načeloma se pri bolnikih izražajo le nekateri izmed kliničnih znakov (Preglednica 2). Poleg očitnih kliničnih simptomov lahko bolezen spremljajo tudi številne subjektivne težave (utrujenost, slabo počutje, motne koncentracije), lokalni simptomi, kot je srbečica, in splošni simptomi kot glavobol, bolečine v sklepih in mišicah. Pri nosečnicah obstaja nevarnost okužbe ploda, saj borelije lahko preidejo preko posteljice (Ružič-Sabljić, 2002). Klinična slika lymške borelioze pri

otročih je podobna klinični sliki pri odraslih (Sood, 1999). Pri otrocih se najpogosteje pojavi posamezen erythema migrans (Gerber in sod., 1996). Raziskovalci predvidevajo, da zgodnje znake lymške borelioze verjetno povzroča bakterija sama, pozne pa predvsem imunopatološki mehanizmi (Edlow, 1999).

Največ primerov lymške borelioze (80 %) se izraža s prizadetostjo in spremembami kože (Steere, 2001; Stanek in Strle, 2003). V Sloveniji erythema migrans povzročajo vsaj štiri vrste borelij: *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi* sensu stricto in *B. spielmanii* (Ružič-Sabljić, 2002 in 2006). Pri bolnikih z erythema migrans so v večini primerov izolirali *B. afzelii* (Picken in sod., 1997 in 1998; Ružič-Sabljić in sod., 2002). *B. garinii* naj bi največkrat povzročala okvare živčevja, *B. burgdorferi* sensu stricto pa razmeroma pogoste okvare sklepov (Cimmino in sod., 1998; Nadelman in Wormser, 1998; Humair in Gern, 2000; Strle, 2006).

Ugotovili so, da se klinični znaki lymške borelioze v Evropi in ZDA razlikujejo. V Evropi je pojavnost kožnega borelijskega limfocitoma in nevroborelioze višja kot v ZDA, kjer pojava kožne spremembe acrodermatitis chronica atrophicans (ACA) niso zabeležili. Vendar pa so ugotovili višjo incidenco lymškega artritisa v ZDA kot v Evropi (Nadelman in Wormser, 1998; Pohl-Koppe in sod., 1998; Strle, 1999b; Wang in sod., 1999).

Borelijska okužba je lahko tudi asimptomatska. Ugotovimo jo z laboratorijskimi preiskavami. V Evropi ocenjujejo, da je kar polovica vseh okužb z *B. burgdorferi* sensu lato asimptomatskih (Sood, 1999; Strle, 2000; Ružič-Sabljić in sod., 2002).

Preglednica 2: Glavni klinični znaki lymške borelioze v posameznih obdobjih bolezni (Strle, 2006: 49).

OBDOBJE BOLEZNI	KLINIČNI ZNAK IN PRIZADETOST ORGANA		ZAČETEK	TRAJANJE
ZGODNJE			(po okužbi)	(brez zdravljenja)
1. stadij: LOKALIZIRANA okužba	EM	koža	nekaj dni - tednov	nekaj tednov - mesecev
	borelijski limfocitom			
2. stadij: DISEMINIRANA okužba	multipli EM	živčevje in možgani	nekaj tednov – mesecev	več mesecev
	nevroborelioza			nekaj tednov
	prizadetost srca (motnje ritma, mio/perikarditis)			več mesecev
	prizadetost sklepov (artritis)			več mesecev
POZNO			(po prvih simptomih* / po okužbi**)	(brez zdravljenja)
3. stadij: KRONIČNA prizadetost	sklepov (artritis)	živčevja (meningitis, poškodbe perifernih živcev)	vsaj 6 (12) mesecev*	neomejeno
	kože (ACA)			

EM= erythema migrans

ACA = acrodermatitis chronica atrophicans

2.5.2 Imunski odziv

Lymška borelioza je kronična bolezen, podobna sifilisu. Obe bolezni imata stopnje izboljšanja in slabšanja stanja. Kljub svoji epizodni pojavnosti imata ti dve spiroheti izredno sposobnost, da se v gostitelju obdržita navkljub humoralnemu in celičnemu imunskemu odzivu, ki ga s svojo prisotnostjo aktivirata (Radolf, 1994).

Obstajajo ugibanja, zakaj se *B. burgdorferi* sensu lato lahko na tako uspešen način izmika imunskemu odzivu gostitelja. Nekateri so mnenja, da se bakterija znotraj ali zunaj celic skrije v predele, ki so slabo dostopni imunskemu sistemu. Drugi menijo, da ima sposobnost spreminjanja oblike ali le površinskih antigenov. Imunološke študije pa domnevajo, da bakterija manipulira z imunskim sistemom gostitelja tako, da zadržuje in/ali preprečuje

njegov odziv (Radolf, 1994; Preac-Mursic in sod., 1996; Brorson Ø. in Brorson S. H., 1998; Barbour, 1998).

Po okužbi z *B. burgdorferi* sensu lato se najprej aktivirajo številne telesne celice, ki sprožijo obsežen vnetni odziv (makrofagi, endotelne celice, nevtrofilci, dendritične celice, mastociti in glia celice) (Stanek in Strle, 2003). Celičnemu odzivu sledi humoralni odziv. Prva specifična IgM protitelesa se začno pojavljati tri do šest tednov po okužbi in so usmerjena proti bičku in beljakovini OspC (Aguero-Rosenfeld in sod., 1996). V poznejši fazi bolezni (en do tri mesece po okužbi) nastajajo bolj kompleksna IgG protitelesa proti beljakovinom OspA, OspB in drugim. IgG protitelesa zaradi pozne pojavnosti v razvoju bolezni niso učinkovita pri preprečevanju okužbe in premagovanju bolezni (Aguero-Rosenfeld in sod., 1996). Pred okužbo lahko ščitijo le, če so prisotna v času klopovega ugriza (Fikrig in sod., 1992).

Borelije z gostiteljem pogosto vzpostavijo ravnotežje, ki je njihovo orožje preživetja. Pri tem ne vzpodbudijo imunskega odziva ali se mu uspešno izognejo (Strle in sod., 1995b).

2.5.3 Diagnoza lymske borelioze

Lymska borelioza je multisistemska bolezen, ki lahko obsega poškodbe kože, živčnega sistema, sklepov in srca. Mikrobiološka potrditev borelijske okužbe je praviloma potrebna pri vseh oblikah okužbe, razen če je prisoten sam po sebi tako značilen pokazatelj okužbe kožni izpuščaj, erythema migrans (Stanek in Strle, 2003; Wilske in sod., 2007).

2.5.3.1 Serološko dokazovanje lymske borelioze

V vsakdanji klinični praksi se za dokaz borelijske okužbe običajno uporabljajo posredne metode, s katerimi se najpogosteje dokazuje prisotnost specifičnih protiteles v serumu bolnika (imunofluorescenca (IFT), encimskoimunski testi (ELISA) in imunoblot (western) testi) (Aguero-Rosenfeld in sod., 2005). Vsaka posamezna metoda ima svoje prednosti in slabosti. Prednosti seroloških metod so predvsem lahka dostopnost testov, hitre in poceni metode. Občutljivost seroloških testov je v poznih fazah bolezni veliko večja kot zgodnjih. Splošen problem serološkega testiranja je zato nizka občutljivost testov pri zgodnji lymski

boreliozi. Serološko dokazovanje je pri preiskovanju lymške borelioze med diagnostičnimi testi najpogosteje uporabljen (Rosa in sod., 1998; Postic in sod., 2000; Stanek in Strle, 2003; Wilske in sod., 2007). Specifična protitelesa lahko dokazujemo tudi v likvorju in sinovijski tekočini bolnikov (Postic in sod., 2000).

2.5.3.2 Izolacija in kultiviranje bakterije

Kultivacija *B. burgdorferi* sensu lato je še vedno, kljub svojim pomanjkljivostim, »zlati« standard med mikrobiološkimi metodami za diagnozo lymške borelioze (Strle, 1999c; Zore in sod., 2002; Wilske in sod., 2007). Njene pomankljivosti so predvsem kompleksna sestava gojišča, visoka cena, časovna zamudnost (tudi do 12 tednov) in nizka občutljivost predvsem v telesnih tekočinah kot so likvor, sinovijska tekočina in kri (Aguero-Rosenfeld in sod., 2005). Metoda je v veliko pomoč pri primerih bolnikov, kjer klinična slika kljub odsotnosti specifičnih protiteles kaže znake borelijske okužbe (npr. atipični erythema migrans, akutna neuroborelioza ali lymška borelioza pri imunsko oslabljenih osebah) (Wilske in sod., 2007).

Osnovno gojišče za izolacijo *B. burgdorferi* sensu lato je MKP (angl. *Modified Kelly Medium*) ali BSK (okrajšava za Barbour, Sitenner, Kelly). Gojišču so dodane nujno potrebne komponente, kot je gradbena surovina peptidoglikana, N-acetilglukozamin, želatin, goveji serumski albumin, zajčji serum in natrijev bikarbonat, brez katerih sta rast in donos manjša (Preac-Mursic in sod., 1986; Barbour in Hayes, 1986; Ružič in sod., 1991; Postic in sod. 2000). Na uspešnost izolacije vplivajo številni dejavniki, kot so: število *B. burgdorferi* sensu lato v kužnini, sposobnost prilagoditve bakterije pri prehodu iz naravnega okolja v *in vitro* okolje, transport kužnine do laboratorija, sestava gojišča, zdravljenje pacienta z antibiotiki in imunski odziv posameznika (Ružič in sod., 1991).

2.5.3.3 Verižna reakcija s polimerazo

Verižna reakcija s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR) je metoda, s katero lahko v kratkem času *in vitro* pomnožimo določen odsek DNA v velikem številu kopij. Danes jo uporabljajo na številnih področjih biomedicinskih raziskav za določanje prisotnosti virusov in bakterij v vzorcih bolnikov (Poljak in sod., 1994). Za dokazovanje

Lyme bolezni so metodo razvili zaradi nizke občutljivosti seroloških testov (Postic in sod., 2000).

PCR uporabljajo za dokaz prisotnosti bakterijskega genoma po principu temperaturno programiranih ciklov. En cikel sestoji iz treh stopenj: 1) denaturacija DNA; 2) vezava začetnih oligonukleotidov; 3) pomnoževanje tarčnega odseka s toplotno stabilnim encimom. Teoretično naj bi se na koncu vsakega cikla število PCR-pridelkov podvojilo in skozi sledeče cikle eksponentno naraščalo (Busch in Nitschko, 1999; Herzog-Velikonja in sod., 2001). V praksi temu ni tako, saj število PCR-pridelkov v zadnjih ciklih doseže efekt »plato«, ko pride do dosežka maksimalne količine PCR-pridelkov (Innis in Gelfand, 1990).

PCR je zelo specifična in občutljiva metoda. Njen predpogoj za uspešno pomnoževanje je predhodno dobro poznavanje nukleotidnega zaporedja vsaj enega dela genoma bakterije (Poljak in sod., 1994). Na specifičnost pomnoževanja vpliva izbira tarčne sekvence, posledično pravilen izbor oligonukleotidnih začetnikov in sonde ter ustrezne koncentracije reagentov, zajetih v reakcijski mešanici. Za specifičnost je pomembna tudi optimalna avtomatska nastavitvev temperatur enega cikla in njihovo število (Poljak in sod., 1994; Schmidt, 1997; Postic in sod., 2000). Za najpomembnejši dejavnik specifičnosti se je pokazala optimalna vezava začetnih oligonukleotidov pred začetkom pomnoževanja. Optimalno vezavo dosežemo z izpostavitvijo reakcijske mešanice visoki temperaturi pred začetkom reakcije (angl. *hot start*) (Herzog-Velikonja in sod., 2001).

Na občutljivost PCR vpliva izguba vzorčne DNA med izolacijo, prisotnost tuje DNA ali inhibitorjev PCR v kliničnem vzorcu in izbira metode pomnoževanja (npr. klasična, vgnezdena) (Schmidt, 1997; Postic in sod., 2000). Povečanje občutljivosti je možno z izbiro vgnezdene PCR, ki z dodatnim notranjim parom oligonukleotidnih začetnikov poveča občutljivost na minimalno količino PCR-pridelka in potrdi njegovo specifičnost (Poljak in sod., 1994; Picken in sod., 1996; Schmidt, 1997; Postic in sod., 2000).

2.5.3.3.1 Izbira tarčnega mesta

Glavna lastnost tarčnega mesta je njegova stabilnost in prisotnost v vseh vrstah človeku nevarnih *B. burgdoreferi* sensu lato. Lahko izbiramo med znanimi tarčnimi geni, ki se ločijo bodisi po konzervativnosti ali po vrstni specifičnosti (Postic in sod., 2000). Do sedaj so v različnih laboratorijih za pomnoževanje uporabili tarčne gene z zapisom na plazmidih in takšne z zapisom na kromosomih (Schmidt, 1997). Plazmidna gena, ki se najpogosteje dokazujeta, sta *ospA*, *ospB* in *ospC*. Med njima je večkrat ciljano dokazovan *ospA*, ki je zaradi svoje spremenljivosti vrstno specifičen tako med vrstami kot tudi znotraj njih (razlog, da se odseki gena *ospA* pri nekaterih vrstah ne pomnožujejo). Tarčni geni na kromosomu, ki so znani po svoji konzervativnosti, so: flagelinski gen, p66, segment gena za 16 S rRNA (*rrs*) in medgenski odsek 5S-23S (*rrf-rrl*). Za dokazovanje borelij se lahko uporablja tudi kateri od nenašteti odsekov DNA, bodisi plazmidni ali kromosomski (Schmidt, 1997; Postic in sod., 2000).

2.5.3.3.2 Izbira oligonukleotidnih začetnikov

Začetniki morajo biti zasnovani tako, da je pomnoževanje enako občutljivo in specifično za vse vrste borelij lymske borelioze in da ne pomnožujejo tarčnih odsekov drugih spirohet, bakterij ali virusov. Njihova dolžina naj bi merila okrog 20 bp, brez polindromskih sekvenc, s stabilnostjo na 5' in nestabilnostjo na 3' koncu ter odsotnostjo komplementarnosti na 3' koncu. Temperatura denaturacije obeh oligonukleotidnih začetnikov mora biti čimbolj podobna (Schmidt, 1997; Postic in sod., 2000).

2.5.3.3.3 Vgnezdena PCR

Različica PCR je bila oblikovana z namenom, da bi z njo dosegli večjo občutljivost. Izkazalo se je, da je princip metode izredno uporaben, ne samo zaradi boljše občutljivosti, temveč tudi zaradi hitre izvedbe. Danes jo uporabljamo za dokazovanje specifičnosti PCR-pridelkov. Gre za to, da se po končanem klasičnem postopku pomnoževanja s prvim parom začetnikov, pomnožuje nastali PCR-pridelek z drugim notranjim parom začetnikov (Poljak in sod., 1994; Llop in sod., 2000). Vgnezdeno PCR lahko izvajamo enostopenjsko ali dvostopenjsko. Princip obeh temelji na oblikovanju dveh parov oligonukleotidnih začetnikov, zunanjih in notranjih, ki onemogočata nastanek vmesnih produktov (Postic in

sod., 2000). Glavna razlika med njima je omejena dejavnost obeh parov oligonukleotidnih začetnikov. V enostopenjski metodi sta ločena z različno temperaturo naleganja na tarčo, v dvostopenjski pa fizično (Schmidt, 1997). Poleg tega se v enostopenjski vgnezdjeni PCR različici uporablja dodatna Gold Taq polimeraza, ki svojo aktivnost obnovi in vzdržuje pri višjih temperaturah (Postic in sod., 2000).

Lastnosti zunanjih začetnikov so daljša sestava, višja temperatura naleganja, nizka koncentracija (do 100 x) v primerjavi z notranjimi začetniki in manj številno pomnoževanje večjega tarčnega izseka. V prvem delu ciklov enostopenjske vgnezdene PCR je temperatura vezave začetnikov višja, da preprečimo hibridizacijo notranjih oligonukleotidnih začetnikov (Postic in sod., 2000). Pomnoževanje v drugem kompleksu ciklov poteka z notranjimi oligonukleotidnimi začetniki, ki se vežejo pri nižji temperaturi in pomnožujejo manjši izsek znotraj predhodno pomnoženega dela genoma *B. burgdorferi* sensu lato. Posebnosti pri izbiri zunanjih in notranjih oligonukleotidov so, da mora zunanji par pomnoževati dovolj velik PCR-pridelek, da se razlikujejo v temperaturi naleganja in da je občutljivost začetnikov visoka, kar omogoča povečanje meje dokazovanja (Llop in sod., 2000).

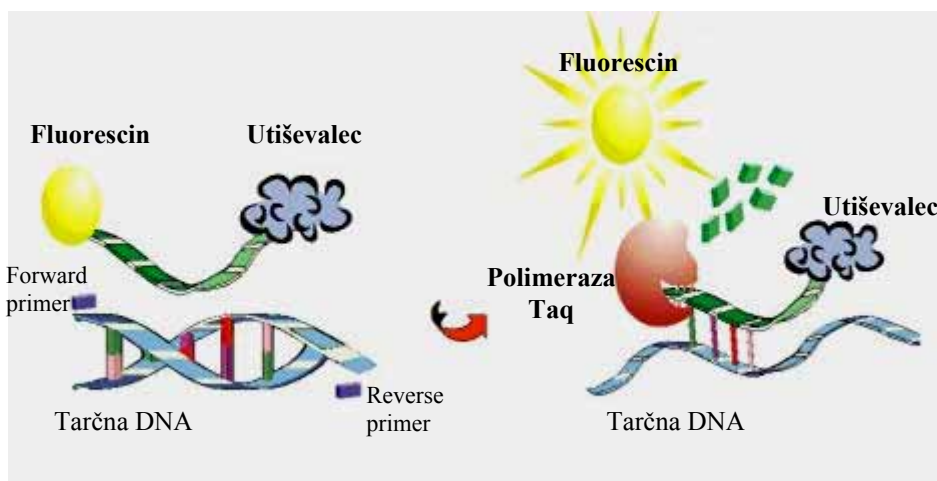
Slabost dvostopenjske vgnezdene PCR je velika nevarnost kontaminacije vzorca pri odpiranju in prenosu nastalih PCR-pridelkov iz prve reakcijske mešanice v drugo. Tega vmesnega koraka enostopenjska vgnezdjena PCR nima, kar zmanjša možnosti pojava navzkrižnih reakcij in lažne pozitivnosti. Prednost enostopenjske vgnezdene PCR je tudi njena višja občutljivost, prihranek časa in nižja poraba reagentov (Poljak in sod., 1994; Llop in sod., 2000).

2.5.3.3.4 PCR v realnem času

Že klasična PCR metoda je dala pomemben pečat molekularni diagnostiki v laboratoriju, dodatno odobravanje se je okrepilo s PCR metodo v realnem času. Pogosto jo opisujejo kot zaprt homogen sistem, kjer pomnoževanje tarčnega izseka in dokazovanje nastalega produkta potekata sočasno v steklenih kapilarah. To je prednost metode, ki jo ločuje od klasične metode PCR in se odraža tako v hitrosti izvajanja, občutljivosti in produktivnosti

kot tudi minimalni možnosti kontaminacije (Wittwer in sod., 1990; Mackay, 2004). Metoda verižnega pomnoževanja v realnem času je pripomogla k razumevnanju dogajanja v PCR reakciji, ugotavljanja učinkovitosti različnih metod DNA ekstrakcije in vpliva nekaterih substanc na inhibicijo pomnoževanja (Read, 2001). Pomankljivost tehnike so previsoki začetni stroški in nezmožno določevanje velikosti PCR-pridelka, za kar je kapilare potrebno odpreti (Mackay, 2004).

Za opazovanje naraščanja količine PCR-pridelka je potrebna uporaba molekul, ki se vežejo na nastale PCR-pridelke. V ta namen se najpogosteje uporabljajo oligonukleotidne sonde, označene s fluorescinom, kar je sprejemljivejše od predhodnega radiogenega označevanja (Mackay, 2004). Poznamo sondo SYBR Green I, hibridizacijsko sondo in sondo TaqMan. Sonda SYBR Green I se veže na vsako dvojnovijačno DNA, kar se je izkazalo tako za prednost kot tudi slabost, saj se posledično veže tudi na nespecifične PCR-pridelke in dimere oligonukleotidnih začetnikov. Ostali sondi, hibridizacijska in TaqMan, imata podoben način delovanja. Obe se vežeta s specifičnimi PCR-pridelki in sta na enem koncu označeni s fluorescinsko molekulo (donor svetlobne energije), na drugem pa s sprejemnikom energije (akceptor). Kadar sta molekuli v neposredni bližini kot prikazuje slika 7, je svetloba fluorescina utišana. Za hibridizacijsko sondo je značilno, da je sestavljena iz dveh fizično ločenih delov, ki se vežeta eden za drugim. Vsak del hibridizacijske sonde vsebuje enega od označevalcev. Sonda TaqMan pa je označena s fluorescinom (5') na enem in utiševalcem (3') na drugem koncu. Fluorescentni signal se zazna, ko polimeraza Taq z 5' → 3' eksonukleazno aktivnostjo na svoji poti razgradi sondo TaqMan. To povzroči fizično ločitev fluorescina in njegovega utiševalca ter posledično sproščanje fluorescentnega signala (slika 7) (Mackay, 2004).



Slika 7: Nastanek fluorescentnega signala sonde TaqMan pri metodi PCR v realnem času (Nucleo acid research facilities, 2007)

Pri vsakem izvajanju PCR testa je pomembna vključitev kontrol, ki nadzirajo prisotnost inhibicije in kontaminacije. Pogost vzrok zaviranja pomnoževanja v kliničnih vzorcih so inhibitorji. Njihovo prisotnost lahko preverjamo s pomnoževanjem »housekeeping« genov, kar poteka vzporedno s pomnoževanjem tarčnega gena (Mackay, 2004). Slaba stran preverjanja inhibicije je prilagoditev pogojev pomnoževanja *B. burgdorferi* sensu lato zaradi pomnoževanja kontrolnih genov. Z visoko izboljšano občutljivostjo testov se poveča tudi možnost kontaminacije. Pri preverjanju kontaminacije je potrebno vključiti pozitivno (znani sevi *B. burgdorferi* sensu lato) in negativno kontrolo, ki ne izključuje možnosti kontaminacije vzorcev. Da bi se izognili vnosu predhodno pomnoženih PCR-pridelkov, je potrebno korake izvedbe PCR prostorsko ločiti in se držati pravila enosmernega prehajanja s postopnim izvajanjem metode (Schmidt, 1997; Postic in sod., 2000).

2.5.3.3.5 Prednosti in slabosti PCR

Tako kot vsaka diagnostična metoda ima tudi PCR svoje prednosti in slabosti. S popolno zadostitvijo optimalnih pogojev reakcije lahko omogočimo nastanek zadostnega števila kopij tarčne DNA in preprečimo nastanek večjih količin nespecifičnih PCR-pridelkov (Poljak in sod., 1994).

Njene prednosti so, da z dokazom borelijske DNA lahko potrdimo sum na lymsko boreliozo, identificiramo spirohete v kužninah in ugotovimo možno koinfekcijo

B. burgdorferi sensu lato skupaj z drugim patogenom, ki se prav tako prenaša s klopi (Schmidt, 1997; Agüero-Rosenfeld in sod., 2005). Nekateri metodo zaradi njene hitrosti, visoke občutljivosti in specifičnosti kujejo v zvezde, vendar njena učinkovitost dokazovanja v tkivih še ni nedvomno potrjena. S PCR ne moremo ločiti živih in mrtvih organizmov (npr. po zdravljenju), postopek je drag in ga izvajajo le v nekaterih laboratorijih (Nadelman in Wormser, 1998; Strle, 1999c; Agüero-Rosenfeld in sod., 2005). Slabost metode je tudi pojav lažno pozitivnih rezultatov (visoka občutljivosti poveča možnost kontaminacije) in lažno negativnih rezultatov (naključne spremembe tarčne borelijske DNA, premalo borelijske DNA v vzorcu) (Schmidt, 1997; Agüero-Rosenfeld in sod., 2005). Zaradi nestandardiziranosti postopkov izolacije in pogojev pomnoževanja je test za diagnostiko lymške borelioze še vedno v razvoju (Mackay, 2004).

2.5.3.3.6 Dokazovanje PCR-pridelkov

Zaradi hitrosti, enostavnosti in nizke cene v ta namen največkrat uporabimo metodo ločevanja delcev DNA po velikosti s pomočjo elektroforeze v gelu, obarvanem z etidijevim bromidom (Poljak in sod., 1994; Busch in Nitschko, 1999). Kadar se v toku elektroforeze pojavi en sam fragment, lahko skoraj zagotovo trdimo, da gre za pozitiven rezultat. V kolikor se pojavi večje število fragmentov, moramo rezultat elektroforeze potrditi še s katero od bolj specifičnih metod dokazovanja. Za najenostavnejšo in hitro se je izkazala encimska restrikcija nastalega PCR-pridelka. Drugi način, s katerim lahko dokončno potrdimo specifičnost PCR-pridelka, pa je določanje njegovega nukleotidnega zaporedja (sekvenčna analiza) ali hibridizacijske tehnike (Poljak in sod., 1994).

Poleg opisanih metod, ki se uporabljajo za dokazovanje okužb s spiroheto *B. burgdorferi* sensu lato, je kar nekaj takšnih, ki niso dobile podpore za uporabo v mikrobiološki diagnostiki. Naziv neustreznih so dobili testi za dokazovanje antigenov *B. burgdorferi* sensu lato v urinu, PCR v urinu in testi ugotavljanaj T-limfocitnega odziva (Wilske in sod., 2007).

2.5.4 Zdravljenje lymške borelioze

V medicini velja pravilo, da je osnova za uspešno zdravljenje zanesljiva diagnoza. Zdravljenje z antibiotiki je koristno v vseh stadijih lymške borelioze, vendar je najučinkovitejše v zgodnjem obdobju razvoja bolezni (Strle, 1999c). V tej fazi z veliko verjetnostjo preprečimo razsoj borelij in pojav poznejših kliničnih znakov. Na učinkovitost zdravljenja imajo poleg lokacije, razširjenosti in trajanja kliničnih simptomov vpliv tudi drugi dejavniki. Za zdravljenje je pomembna predvsem primerna izbira antibiotika, velikost odmerka, trajanje zdravljenja, možnost pojava stranskih učinkov in privolitev pacienta v zdravljenje (Stanek in Strle, 2003).

Ena od možnosti neuspelega zdravljenja je obstoj borelij v tkivu tudi po končani terapiji. Tej možnosti kljubujejo poročila o kliničnih in eksperimentalnih primerih občutljivosti borelij za antibiotike (Preac-Mursic in sod., 1989; Strle in sod., 1996; Stanek in Strle, 2003). Včasih se bakterijam uspe izogniti tudi delovanju antibiotikov (Preac-Mursic in sod., 1989; Logar in sod., 1999).

Pri bolnikih, ki niso zdravljeni se okužba lahko sama pozdravi ali ostanejo borelije nenehno prisotne v tkivu, s čimer lahko povzročajo ponavljajoče napade lymške borelioze, oziroma bolezen postane kronična (Klempner in Huber, 1999). Do sedaj še nobena študija ni potrdila, da bi bilo podaljševanje zdravljenja z antibiotiki učinkovitejše (Wormser in sod., 2002; Stanek in Strle, 2003).

2.5.5 Preventivna zaščita pred okužbo

Največ za preprečevanje okužbe lahko storimo sami. Predvsem za ljudi, ki živijo na endemičnih območjih okuženih klopov, je pomembno, da se zavedajo nevarnosti okužbe in se izogibajo izpostavljenosti. Pred odhodom v gozdna območja se je priporočljivo primerno zaščititi z obleko, obuvali, kožnimi repelenti itd. Po prihodu domov se je potrebno temeljito pregledati in morebitne pritrjene ali še ne pritrjene klope odstraniti in mesto vboda dobro razkužiti (Ružić-Sabljić, 2002; Stanek in Strle, 2003).

Pritrjenega klopa moramo takoj odstraniti s pinceto, tako da ga zagrabimo tik ob koži in previdno, počasi izvlečemo (Stanek in Strle, 2003). Zaradi majhne verjetnosti, da se po enem vbodu klopa razvije lymska borelioza, preventivno jemanje antibiotikov ni smiselno (Wormser in sod., 2002; Stanek in Strle, 2003).

Ena izmed preventiv je tudi možnost cepljenja. Najbolj obetavna komponenta na spiroheti je njena beljakovina OspA (Sadzine in Barbour, 1996). Takšno cepivo od leta 1990 že poznajo veterinarji za živali (Nadelman in Wormser, 1998). Cepivo za človeka, ki so ga izdelali Američni, je učinkovito predvsem v ZDA, kjer je za človeka patogena le ena vrsta borelij, *B. burgdorferi sensu stricto*, ki jo prenaša *Ixodes scapularis* (Stanek in Strle, 2003). V Evropi in Aziji cepivo ni najbolj primerno, saj so tu borelije bolj heterogene in posledično tudi OspA proteini bolj raznoliki kot v Severni Ameriki (Nadelman in Wormser, 1998).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Humani vzorci

V nalogo smo vključili 135 rutinskih humanih vzorcev, ki so jih zaradi suma na lymsko boreliozo na Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani v Laboratorij za diagnostiko borelioz in leptospiroze poslali iz Splošne bolnice v Mariboru, Splošne bolnice v Celju, iz Klinike za infekcijske bolezni in vročinska stanje ter Dermatovenerološke klinike Kliničnega centra v Ljubljani. Uporabili smo 52 vzorcev likvorja, dobljenega z lumbalno punkcijo, 42 vzorcev kože, 33 vzorcev sklepne tekočine kolena, 5 vzorcev krvi in po en vzorec očesne vodice, očesne steklovine ter košček sklepne sinovijske membrane. Vsi ti vzorci so bili v letu 2006 namenjeni za dokaz borelijske DNA s PCR, ki jo v laboratoriju uporabljajo za rutinsko delo.

Zbrane kužnine so bile do uporabe shranjene na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, iz kužnin izolirana DNA pa se je do opravljanja PCR shranila na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.1.2 Kulture bakterij *B. burgdorferi* sensu lato

Za kvalitativno vrednotenje testov PCR smo za pozitivne kontrole uporabljali iz humanih vzorcev kultivirane seve *B. garinii*, *B. afzelii* in *B. burgdorferi* sensu stricto. Izolirane DNA pozitivnih humanih vzorcev so bile ves čas shranjene v hladilni omari na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ v Laboratoriju za diagnostiko borelioz in leptospiroze na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

3.2 METODE

3.2.1 Izolacija DNA iz humanih vzorcev

Bakterijsko in gostiteljevo DNA smo iz humanih vzorcev osamili s kompletom reagentov QIAamp® DNA MiniKit (QIAGEN, Santa Clara, CA, USA). Izolaciji iz tkiv in telesnih tekočin sta se med sabo razlikovali le po uvodnem delu izolacije pred uporabo reagentov. Namen izolacije je bil dobiti čimbolj in čimveč čiste DNA, ki smo jo lahko kasneje uporabili za PCR. Metoda je temeljila na absorpciji molekule DNA na silica-gel membrano.

Košček tkiva, ki je bil do uporabe shranjen na $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, smo pred izolacijo DNA odmrznili in razrezali na čim manjše dele. Kri, prinešeno v laboratorij v epruvetki z EDTA, smo sprva 10 minut centrifugirali pri 500-800 obratih in s tem odstranili eritrocite in levkocite. Za tem smo čim več supernatanta prenesli v eno ali več mikrocentrifugirk. Sledilo je centrifugiranje na 15.000 obratih od 15 minut do 1 ure, saj v krvi oz. plazmi pričakujemo nizko število borelij, zato smo jih želeli sedimentirati. Ostale telesne tekočine, kot je likvor, sinovijska tekočina, seč in druge smo vsaj 15 minut (do 1 ure) centrifugirali na 15.000 obratih. Po končanem centrifugiranju smo v mikrocentrifugirkah pustili le usedlino, supernatant pa zavrgli.

Usedlinam ali na drobno razrezanemu tkivu smo dodali 180 μl pufra ATL in 20 μl proteinaze K. Vse skupaj smo dobro premešali in inkubirali na $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ v rahlo tresajočem termomikserju. Po enourni inkubaciji oz. dokler se tkivo ni popolnoma raztopilo (lahko tudi čez noč), smo v primeru nastanka kondenza suspenzijo rahlo centrifugirali. Dodali smo 200 μl pufra AL, dobro premešali in za 10 minut pustili na $70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po potrebi smo ponovno hitro centrifugirali, tako da so se kapljice s stene mikrocentrifugirke združile s suspenzijo. Suspenziji smo dodali 200 μl etanola (96-100 %), skrbno premešali in za kratek čas centrifugirali. Nato smo v 2 ml zbiralne epruvetke postavili epruvetke s silika-gel membrano. Vanje smo prepipetirali obdelan vzorec in pazili, da se nismo dotaknili njihovega roba.

Epruvetko s filtrom (silika-gel membrano) v zbiralni epruveti smo zaprli in za 2 minuti centrifugirali na 8000 obratov. Za tem smo epruvetko previdno prestavili v novo zbiralno epruveto, staro s prefiltrirano tekočino pa zavrgli. V epruvetko smo dodali 500 μ l pufru AW-1, 2 minuti centrifugirali na 8000 obratih in nato staro zbiralno epruvetko nadomestili z novo. Po tem smo dodali še 500 μ l pufru AW-2 in 3 minute centrifugirali na največ možnih obratih (npr. na 15.000). Na zadnje smo epruvetko s filtrom prestavili v 1,5 ml mikrocentrifugirko. V epruvetko smo odpipetirali 200 μ l pufru AE ali destilirane vode, pustili stati 1 minuto na sobni temperaturi in nato 1 minuto centrifugirali na 8000 obratih. Dokončno obdelan vzorec smo shranili na -20 °C.

3.2.2 Vgnezdena PCR

V raziskavi smo v laboratoriju izvajali dva različna protokola vgnezdene PCR z enakim principom, vendar različnim načinom izvedbe (drugačni začetni oligonukleotidi, DNA polimeraza, pogoji pomnoževanja, mesto vezave itd.). Primerjali smo vgnezdeno PCR, kjer se pomnožuje gen za OspA in vgnezdeno PCR, kjer se pomnožujejo medgenski odseki rrf-rrl (med 5S in 23S rRNA). Postopki, kot so izolacija DNA iz kužnine, priprava reakcijske mešanice, dodajanja vzorcev v PCR reakcijsko mešanico, pomnoževanje in dokaz PCR-pridelka, so se izvajali v ločenih prostorih, da ne bi prihajalo do kontaminacij med vzorci.

3.2.2.1 Verižno pomnoževanje gena OspA

Celotna metoda pomnoževanja gena za OspA bakterije *B. burgdorferi* sensu lato je sestavljena iz dveh ločenih stopenj. Vsaka stopnja posamično obsega 30 ciklov pomnoževanja. V prvih 30 ciklih se je pomnoževal 560 bp dolg odsek gena za OspA, v drugih 30 ciklih pa se je znotraj tega pomnoževal krajši odsek dolžine 351 bp. Sprva sta bila vsem potrebnim reagentom v reakcijski mešanici (glej preglednico 3) dodana zunanja začetna oligonukleotida OspA ext 34 in OspA ext 35 (preglednica 4). V vsakem eksperimentu smo za kontrolo kontaminacije uporabili po najmanj eno negativno kontrolo, kjer smo namesto 5 μ l vzorčne DNA dodali destilirano vodo, in najmanj eno pozitivno kontrolo, kamor smo vnesli 5 μ l znane vrste *B. burgdorferi* sensu lato (*B. garinii* = 6,72 ng/ μ l; *B. afzelii* = 5,88 ng/ μ l; *B. burgdorferi* sensu stricto = 17,78 ng/ μ l).

Po nanosu pozitivne kontrole smo si vsakič zamenjali rokavice, da ne bi kontaminirali okolice. Za preprečevanje kontaminacije smo ves čas sledili zapovedim dobre laboratorijske prakse (Poljak in sod., 1994).

Po končanem prvem delu pomnoževanja smo 2 μ l PCR-pridelka prenesli v novo pripravljeno reakcijsko mešanico z novima začetnima oligonukleotidoma (preglednica 3). Vlogo pomnoževanja sta tokrat dobila notranja začetna oligonukleotida OspA int 36 in OspA int 37 (preglednica 4). Pridelek druge stopnje je ustrezal dolžini 351 bp.

Preglednica 3: Koncentracije in volumni reagentov za reakcijsko mešanico vgnedzenega pomnoževanja gena za OspA bakterije *B. burgdorferi* sensu lato.

Reagent	Začetna koncentracija	Volumen v mešanici za OspA ext 34 in 35 (μ l)	Volumen v mešanici za OspA int 36 in 37 (μ l)	Končna koncentracija
Voda		30,25	33,25	
Pufer	10 x	5	5	1 x
MgCl ₂	25 mM	5	5	2,5 mM
dNTP mix	10 mM	4	4	0,2 mM
Začetna oligonukleotida	1 μ g/ μ l	0,25	0,25	0,005 μ g/ μ l
Polimeraza Taq	5 E/ μ l	0,25	0,25	1,25 E
VZOREC	ni določena	5	2	ni določena
SKUPAJ		50	50	

E= enota katalitske aktivnosti encima

Pogoji pomnoževanja so bili v vseh ciklih enako programirani. Začetna denaturacija je potekala pri 95 °C 45 s, pripenjanje začetnikov pri 50 °C 45 s in podaljševanje verige pri 72 °C 60 s. Po popolnoma zaključeni metodi smo dobljene PCR-pridelke shranili na + 4 °C.

Preglednica 4: Sekvence začetnih oligonukleotidov gena za OspA (v smeri 5' → 3'), genska pozicija, mesto vezave na genu in velikost PCR-pridelka (Zore in sod., 2002: 607).

Začetni oligonukleotid	Nukleotidno zaporedje	Genska pozicija	Mesto vezave	Velikost
OspA ext 34	5'-GAGCTTAAAGGAACTTCTGATAA-3'	zunanja	334-365	560 bp
OspA ext 35	5'-GTATGTTGTAAGTGAATTGT-3'		874-894	
OspA int 36	5'-ATGGATCTGGAGTACTTGAA-3'	notranja	362-381	351 bp
OspA int 37	5'-CTTAAAGTAACAGTTCCTTCT-3'		693-713	

3.2.2.2 Verižno pomnoževanje medgenske regije rrf-rrl

V tem primeru smo pomnoževali medgenski odsek 5S-23S (rrf-rrl) *B. burgdorferi* sensu lato v velikosti 226-256 bp (Postic in sod., 2000). Vgnezdna reakcija je potekala v eni sami epruvetki. Pri tej različici vgnezdene PCR smo uporabili zunanji par SPA1 in SPA2 ter notranji par P1 in P2 (preglednica 5). Poleg oligonukleotidnih začetnikov smo v končni volumen reakcijske mešanice 50 µl dodali tudi druge reagentne določene koncentracije (glej preglednico 6) in 10 µl iz humanega vzorca izolirane DNA. Pri vsakem eksperimentu smo za kontrolo kontaminacije uporabili pozitivne in negativne kontrole. Za negativno kontrolo smo mešanici dodali 10 µl vode, za pozitivno kontrolo pa smo dodali mešanico 5 µl vode in 5 µl izolirane DNA posamezne vrste *B. burgdorferi* sensu lato (*B. garinii* = 6,72 ng/µl; *B. afzelii* = 5,88 ng/µl; *B. burgdorferi* sensu stricto = 17,78 ng/µl). Po nanosu pozitivne kontrole smo si vsakič zamenjali rokavice, da ne bi kontaminirali okolice. Za preprečevanje kontaminacije smo ves čas sledili zapovedim dobre laboratorijske prakse (Poljak in sod., 1994).

Preglednica 5: Zaporedja začetnih oligonukleotidov medgenskega odseka rrf-rrl (v smeri 5' → 3'), genska pozicija, mesto vezave na genu ter velikost PCR-pridelka (Postic in sod., 2000: 240).

Začetni oligonukleotid	Nukleotidno zaporedje	Genska pozicija	Mesto vezave	Velikost
SPA1	5'-TAAGCTGACTAATACTAATTACCCGTATCT-3'	zunanja	rrl A 2890-2919	se ne preverja
SPA2	5'-AATCTTGGGATCAATAAATGTTTGCTTCTC-3'		rrl B 113-84	
P1	5'-CTGCGAGTTCGCGGGAGA-3'	notranja	rrf A 77-95	226-256 bp
P2	5'-TCCTAGGCATTCACCATA-3'		rrf B 38-20	

Preglednica 6: Koncentracije in volumni reagentov za reakcijsko mešanico vgnezdenega pomnoževanja medgenskega odseka 5S-23S (rrf-rrl) *B. burgdorferi* sensu lato.

Reagent	Začetna koncentracija	Volumen (μL)	Končna koncentracija
voda		27,2	
pufer	10 x	5	1 x
dNTP mix	10 mM	4	0,2 mM
MgCl ₂	25 mM	3	1,5 mM
P1	50 μM	0,1	0,1 μM
P2	50 μM	0,1	0,1 μM
SPA1	0,005 μM	0,1	0,00001 μM
SPA2	0,005 μM	0,1	0,00001 μM
Polimeraza Taq (standardna)	5 E/ μL	0,1	0,5 E/ μL
Polimeraza Gold Taq	5 E/ μL	0,3	1,5 E/ μL
VZOREC	ni določena	10	ni določena
SKUPAJ		50	

dNTP mix= 200 μM dATP, 200 μM dCTP, 200 μM dGTP200 μM , dTTP

E= enota katalitske aktivnosti encima

Pomnoževanje medgenskega odseka z vgnezdeno PCR se je začelo z 20 cikli. V teh ciklih sta vlogo pomnoževanja imela zunanja začetna oligonukleotida SPA1 in SPA2. Vsak cikel se je začel s tremi minutami denaturacije pri 93 °C, 2 minutami pripenjanja začetnih oligonukleotidov pri 70 °C in 2 minutama podaljševanja pri 72 °C. Po 20 končanih ciklih je sledilo 40 ciklov pomnoževanja z notranjima oligonukleotidnima začetnikoma P1 in P2. Denaturacija v teh ciklih je potekala 1 minuto pri 93 °C, sledili sta 2 minuti prilagajanja začetnikov pri 50 °C in 2 minuti podaljševanja pri 72 °C.

3.2.3 Analiza PCR – pridelkov dobljenih z vgnezdeno PCR

Dobljene PCR-pridelke smo po pomnoževanju nanесли na predhodno pripravljen horizontalni 1 % agarozni gel. Gel smo pripravili v 50 ml 1 x koncentriranem TAE pufru (Tris baza/Acetate/EDTA), ki smo ga obarvali s 3,5 μl etidijevega bromida (0,5 $\mu\text{g/ml}$ H₂O). Pred nanosom vzorcev v jamice gela smo 10 μl PCR-pridelka zmešali skupaj s

kapljico 0,36 mM brom fenol modrega barvila (SIGMA-Aldrich, St. Louis, ZDA), da smo sledili poteku elektroforeze. Elektroforeza je potekala 20 minut v 1 x TAE pufru pri napetosti 120 V in toku 80 mA (10 x TAE= 48,46 g/L [0,4 M] Tris; 12,01 g/L [0,2 M] ocetna kislina; 3,72 g/L [0,01 M] EDTA).

Elektroforezni gel smo po 20 minutah elektroforeze pogledali pod UV lučjo, si poiskali morebitne pozitivne vzorce in slikali z UV-kamero. Pod UV lučjo so se bendi z manj PCR-pridelka bolje videli v primerjavi s posnetkom narejenim s fotokamero, ki ni imela dovolj velike ločljivosti, da bi lahko posnela takšne bende.

3.2.4 Encimska restrikcija PCR-pridelkov (medgenske regije rrf-rrl) z endonukleazo *MseI*

Po končani gelski analizi PCR-pridelkov smo zbrali vse pozitivne in domnevno pozitivne vzorce, pri katerih smo bend videli pod UV lučjo, na sliki kamere pa ne, ter jih uporabili za restriksijsko analizo z encimom *MseI* (Biolabs, Ipswich, MA, ZDA). Restrikcijo zbranih pozitivnih PCR-pridelkov smo naredili z namenom, da potrdimo, ali pomnožen pridelek pripada *B. burgdorferi* sensu lato. Z encimom *MseI* smo pomnoženo območje 5S-23S razrezali na manjše fragmente in jih prikazali z elektroforezo.

3.2.4.1 Priprava poliakrilamidnega gela za prikaz restrikcije PCR-pridelkov

Gel debeline 1 mm za prikaz PCR-pridelkov smo naredili tako, da smo zmešali vse reagente, ki jih prikazuje preglednica 7. Uporabili smo primerno stojalo, v katerega smo lahko vpeli po dva modelčka za gel (Bio-Rad, München, Nemčija). V dobro sestavljen modelček, ki ni prepuščal tekočine, smo z injekcijsko iglo do približno 2 cm pod vrhom vbrizgali 16 % ločevalni gel (preglednica 7). Do vrha smo modelček zapolnili z demineralizirano vodo, da se je gladina gela izravnala. Vse skupaj smo pustili stati 1 uro, da se je gel dobro strdil. Ko se je ločevalni gel strdil, smo vodo s filter papirjem popivnali, vstavili glavniček in do vrha vbrizgali 5 % gel, namenjen koncentriranju vzorca (preglednica 7). Gel za koncentriranje vzorca smo morali nanesti v 10 minutah, saj je zelo hitro polimeriziral, hkrati pa smo morali biti pazljivi, da pri nanašanju niso nastajali mehurčki. Pripravljene poliakrilamidne gele smo lahko uporabili takoj ali jih do uporabe (največ en teden) shranili na +4 °C v vlažno posodo.

Preglednica 7: Volumni reagentov za pripravo poliakrilamidnih gelov (za 2 gela).

Reagent	16 % ločevalni gel	5 % gel za koncentriranje vzorca
Voda (demineralizirana)	6,6 ml	3,8 ml
10 x TBE	1,33 ml	500 µl
Akrlamid (19/1 40 %) (Amresco, Solon, ZDA)	5,33 ml	650 µl
Amonijev persulfat 10 % (APS)	100 µl	40 µl
TEMED (Bio-Rad, Hercules, ZDA)	10 µl	12 µl

TBE = Tris/Borate/EDTA (10 x TBE= 107,78 g/L [0,89 M] Tris; 55,0 g/L [0,89 M] borova kislina; 7,44 g/L [0,02 M] EDTA); TEMED = N, N, N', N' Tetramethylethylene diamine

3.2.4.2 Priprava restrikcijske mešanice za rezanje z endonukleazo

V reakcisko mešanico smo poleg endonukleaze *MseI* dodali ustrezno količino pufru za encim (pufer 2, Biolabs, Ipswich, MA, ZDA) in BSA (angl. bovine serum albumin), kot prikazuje preglednica 8. Mešanico smo porazdelili v vsako epico po 4 µl in ji dodali 20 µl pozitivnega PCR-pridelka. Da smo aktivirali endonukleazo, smo raztopine v epicah inkubirali 2 uri na 37 °C v termobloku. Po končani inkubaciji smo naredili elektroforezo na poliakrilamidnem gelu.

Preglednica 8: Volumni, začetne in končne koncentracije reagentov za pripravo restrikcijske mešanice z endonukleazo *MseI*.

Reagent	Začetna koncentracija	Volumen na 1 vzorec	Končna koncentracija
Pufer za encim	10 x	3,15 µl	1 x
BSA	100 x	0,35 µl	1x
<i>MseI</i>	10 E/ µl	0,5 µl (5 E)	2 E/ µl

BSA= goveji serumski albumin (angl. bovine serum albumin)

E= enota katalitske aktivnosti encima

3.2.5 Analiza fragmentov po rezanju na vertikalnem poliakrilamidnem gelu

Stojalo z dvema vpetima geloma smo vstavili v banjico. V prostor med geloma smo vlili TBE pufer (Tris/Borate/EDTA) tako, da je gladina pufru prekrila jamice vertikalnega gela.

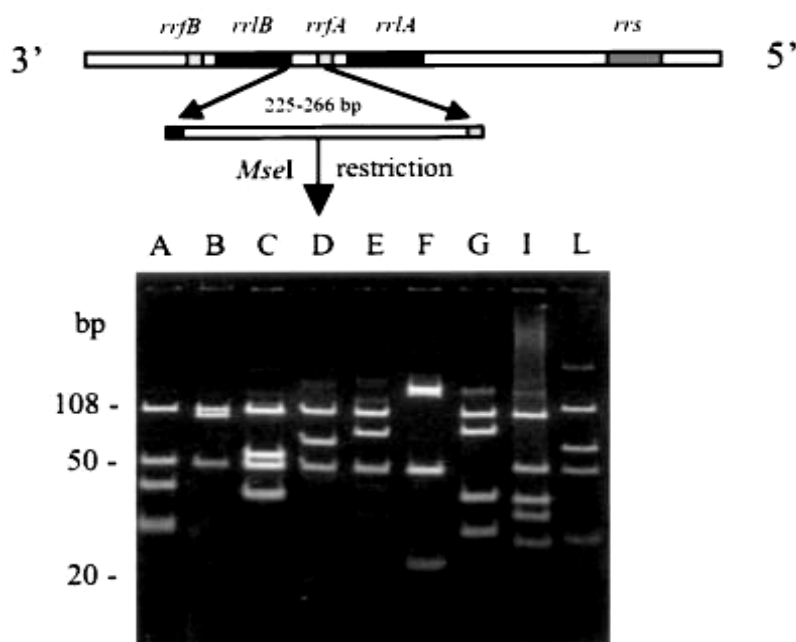
Po odstranitvi glavničkov iz gela smo vsakemu vzorcu dodali kapljico 0,36 mM brom fenol modrega barvila, dobro premešali in previdno vnesli v jamico na gelu. Pred nanosom naslednjega vzorca smo iglo, s katero smo nanašali vzorce v gel, trikrat dobro sprali v TBE pufru. Po nanosu vseh vzorcev smo v banjico dolili preostali TBE pufer in priklopili na napetost 110 V. Vertikalno elektroforezo smo pustili teči 2 uri. Za tem smo gele odpeli iz stojala, jih ločili od stekla, odrezali sledi glavnička in jih označili tako, da smo vedeli, kam smo nanесли prvi vzorec. Gele smo nato 30 minut barvali v prelivajoči se raztopini z etidijevim bromidom (1 µg/ml) in jih slikali pod UV kamero.

3.2.5.1 Tipiziranje *B. burgdorferi* sensu lato po končani analizi razrezanih PCR-pridelkov

Po restrikciji PCR-pridelka smo ločene fragmente vzorcev v vertikalnem akrilamidnem gelu primerjali z značilno razporeditvijo fragmentov samih borelijskih vrst. Vrsto *B. burgdorferi* sensu lato smo tipizirali na podlagi vzorca restrikcije medgenskega odseka rrf-rrl (5S-23S), kot je prikazano na preglednici 9 in sliki 8 (Postic in sod., 1996).

Preglednica 9: Prikaz polimorfizma v velikosti fragmentov različnih borelijskih vrst po rezanju PCR-pridelka z endonukleazo *MseI* (Wang in sod., 1999: 638).

	<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto	<i>B. garinii</i>		<i>B. afzelii</i>
Velikost PCR- pridelka (bp)	254	253	253	246
Velikosti <i>MseI</i> restrikcijskih fragmentov	-	-	-	-
	108	108	108	108
	-	95	-	-
	-	-	-	-
	-	-	-	68
	-	-	57	-
	51	50	50	50
	-	-	-	-
	38	-	38	-
	29	-	-	-
	28	-	-	-
	-	-	-	20
	-	-	-	-
-	-	-	-	



Slika 8: Prikaz polimorfizma restrikcijskih fragmentov po rezanju z endonukleazo *MseI*: *B. burgdorferi* sensu stricto (vzorec A), *B. garinii* (vzoreca B in C), *B. afzelii* (vzorec D), *B. japonica* (vzorec E), *B. valaisiana* (vzorec F), *B. lusitanae* (vzorec G), *B. bissettii* sp. nov. (vzorec I) in *B. andersonii* (vzorec L) (Postic in sod., 1996: 242).

3.2.6 Pomnoževanje dela gena za flagelin *B. burgdorferi* sensu lato v realnem času

Tarčno mesto PCR v realnem času je bil del gena za flagelin. Nalogo pomnoževanja 230 bp velikega fragmenta so imeli za borelije specifični oligonukleotidni začetniki. Začetnike so sestavili v Laboratoriju bakteriologije na oddelku za Infekcijske bolezni Univerze Strasbourg, Francija. V istem laboratoriju so sintetizirali tudi za borelije specifično sondo TaqMan, ki je bila na 5'koncu označena s fluoroforom na 3'koncu pa z utiševalcem fluorofora. Za izvedbo verižnega pomnoževanja s polimerazo smo iz njihovega laboratorija dobili gotove delovne mešanice specifičnih začetnikov in univerzalno sondo za dokazovanje borelij v realnem času.

PCR reakcija je potekala v 20 μ l kapilarah, v katere smo poleg oligonukleotidnih začetnikov in sonde za dokazovanje v realnem času dodali tudi preostale reagentne, navedene v preglednici 10.

Preglednica 10: Volumni, začetne in končne koncentracije reagentov za pripravo PCR reakcijske mešanice za pomnoževanje v realnem času.

Reagent	Oznaka	Začetna koncentracija	Volumen (μl)	Končna koncentracija
Master mix*	LightCycler FastStart DNA Master ^{plus} Hybprobes	5 x	4	1 x
"Forward" oligonukleotidni začetnik	FlaBbsl2a	10 μM	1	0,5 μM
"Reverse" oligonukleotidni začetnik	FlaBbsl4c	10 μM	1	0,5 μM
Univerzalna sonda	sonda TaqMan	2 μM	2	0,2 μM
Voda	prečiščena voda		7	
VZOREC		ni določena	5	
SKUPAJ			20	

* Master mix vsebuje:

- MgCl₂,
- FastStart Taq DNA polimerazo, ki je aktivna le pri visokih temperaturah (kemično spremenjena oblika termostabilne polimeraze Taq DNA, ki ni aktivna nad 75 °C)
- dNTP in pufer

Med postopkom priprave reakcijske mešanice smo za kontrolo kontaminacije imeli po eno negativno kontrolo, v katero smo dodali 5 μl prečiščene vode, jo zaprli pred (kontrola reakcijskega mix-a) in po (kontrola DNA) nanosu vseh vzorcev, vključno s pozitivnimi kontrolami. Občutljivost metode smo preverili s pozitivno kontrolo znane vrste *B. burgdorferi* sansu lato (*B. garinii* = 6,72 ng/μl; *B. afzelii* = 5,88 ng/μl; *B. burgdorferi* sensu stricto = 17,78 ng/μl). Po nanosu pozitivne kontrole smo si vsakič zamenjali rokavice, da ne bi kontaminirali okolice. Za preprečevanje kontaminacije smo ves čas sledili zapovedim dobre laboratorijske prakse (Poljak in sod., 1994).

Pred začetkom pomnoževanja tarčnega dela gena za flagelin *B. burgdorferi* sansu lato se je temperatura v aparaturi za 10 minut povzpela na 95 °C (»hot start«). Sledilo je 55 ciklov, v katerih je denaturacija pri 95 °C potekala 10 s, pripenjanje začetnih oligonukleotidov pri 55 °C 15 s in podaljševanje verige pri 72 °C 15 s. Po končanem pomnoževanju so se vsi vzorci v kapilarah pri 37 °C hladili 30 s.

3.2.6.1 Princip detekcije pomnoženih PCR-pridelkov s sistemom LightCycler

V času pripenjanja začetnih oligonukleotidov se je sonda komplementarno vezala znotraj tarčne flagelinske sekvence. S pričetkom pomnoževanja polimeraza FastStart Taq DNA ni imela le vloge pomnoževanja, temveč tudi 5' eksonukleazno aktivnost, s katero je hidrolizirala sondo na svoji poti. S hidrolizo sonde se je fluoroforna molekula odcepila od bližnjega utiševalca. Tako je sproščena fluoroforna molekula ob dražljaju s svetlobo določene valovne dolžine iz aparature oddajala svetlobo drugačne valovne dolžine, ki je odstopala od fluorescence ozadja in jo je LightCycler 2.0 (Roche Applied Science, Mannheim, Nemčija) lahko zaznal. Princip detekcije povečevanja PCR-pridelka z aparaturo LightCycler je, da na koncu vsakega cikla izmeri količino fluorescentne svetlobe in sproti izrisuje graf. Kopičenje že nastalega PCR-pridelka ni imelo na proces pripenjanja in hidrolizo sonde v vsakem ciklu nobenega vpliva.

3.2.6.2 Analiza rezultatov po pomnoževanju flagelinske sekvence s PCR v realnem času

Naprava LightCycler je med potekom eksperimenta sproti merila signal fluorescence. Po zaključenem programu pomnoževanja smo dobljene rezultate analizirali z absolutno kvantifikacijo. Program LightCycler 4.0 nam je izrisal krivuljo pomnoževanja s cikli na x-osi in fluorescenco na y-osi in poleg vzorcev izpisal CP točke («crossing point»). CP točke so nam povedale, v katerem ciklu se je fluorescenca vzorca povzpela nad fluorescenco ozadja (fluorescenca, ki je utiševalec ni uspel prekriti) oziroma v katerem ciklu pomnoževanja je bil preiskovan vzorec zaznan kot pozitiven.

3.2.6.3 Priprava reagentov za PCR reakcijsko mešanico v realnem času

Master mix mešanica je bila pripravljena po navodilih proizvajalca (Roche Applied Science). Priprava sonde in oligonukleotidnih začetnikov je prikazana v preglednici 11.

Preglednica 11: Priprava univerzalne sonda in oligonukleotidnih začetnikov iz še nerazredčene raztopine reagentov.

Reagent	Koncentracija nerazredčene raztopine	Volumen (μl)	Dodatek vode (μl)
univerzalna sonda*	20 μ M	22	198
začetni oligonukleotidi	100 μ M	25	225

* hranimo jih zaščitene z aluminijasto folijo, da preprečimo vpliv svetlobe na razpad fluorescentne molekule.

4 REZULTATI

S tremi različnimi protokoli PCR smo dokazovali prisotnost borelijske DNA v 135 humanih vzorcih. Preglednica 13 prikazuje vrsto in število vzorcev, ki so bili obdelani za dokazovanje DNA *B. burgdorferi* sensu lato. Vzorce smo vrednotili le kvalitativno, saj smo jih po detekciji opredelili kot pozitivne ali negativne. Pri enostopenjski različici vgnezdene PCR, kjer je bila tarča dokazovanja medgenski odsek 5S-23S, smo po kvalitativnem vrednotenju na elektroforeznem gelu pozitivne vzorce zbrali za nadaljnjo analizo. Zbranim pozitivnim vzorcem smo po restrikciji z *MseI* endonukleazo glede na razporeditev fragmentov na poliakrilamidnem gelu določili vrsto *B. burgdorferi* sensu lato.

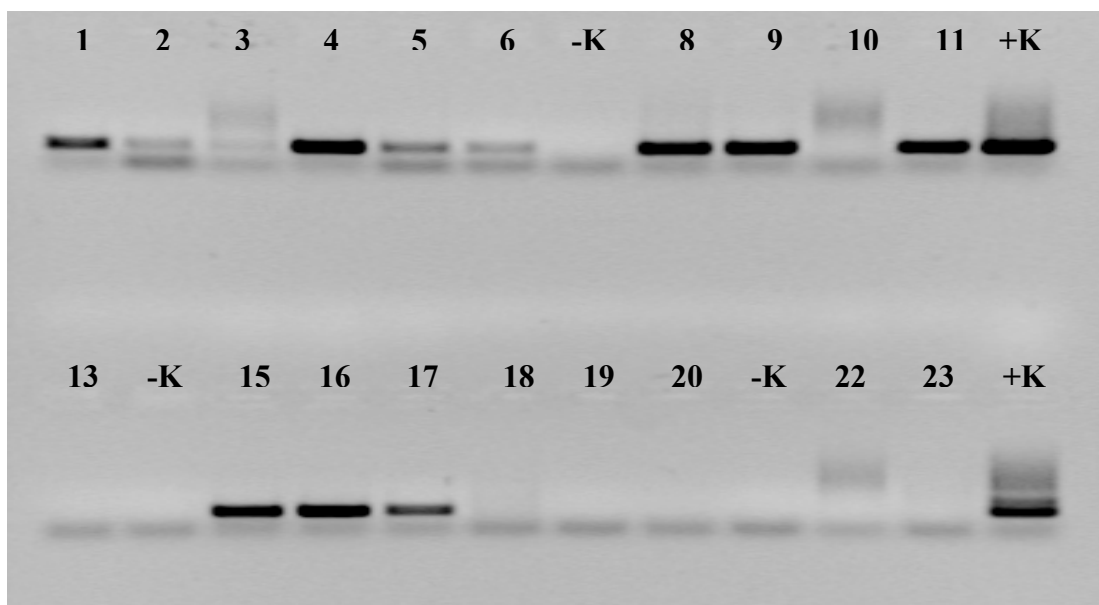
Preglednica 13: Vrsta in število kužnin uporabljenih za dokazovanje prisotnosti borelijske DNA.

KUŽNINA	Št. vseh vzorcev
Likvor	52
Koža	42
Kolenski punkt	33
Kri	5
Ostalo*	3
SKUPAJ	135

* po en vzorec očesne vodice, očesne steklovine ter košček sinovijske membrane

4.1 DOLOČANJE *B. burgdorferi* sensu lato V HUMANIH VZORCIH S POMNOŽEVANJEM IN DOKAZOM GENA ZA *OspA* Z DVOSTOPENJSKO RAZLIČICO VGNEZDENE PCR

Po končanem pomnoževanju gena *ospA* z dvostopenjsko vgnezdeno metodo smo velikost dobljenega pridelka posameznega vzorca primerjali z velikostjo pozitivnih kontrol oz. znanih vrst *B. burgdorferi* sensu lato. Slika 10 prikazuje dobljene rezultate pomnoževanja.



Slika 10: Dokazovanje 560 bp velikega odseka gena za beljakovino OspA po končanem PCR pri 19 naključnih vzorcih, treh negativnih in dveh pozitivnih kontrolah

[1-6, 8-9, 11, 15-17 – pozitivni vzorci; 10, 13, 18-20, 22-23 – negativni vzorci; + K – pozitivna kontrola (12 - *B. afzelii* = 5,88 ng/μl, 24 – *B. garinii* = 6,72 ng/μl); -K – negativna kontrola (7, 14, 21 - voda)]

Z dvostopenjsko vgnezdno PCR smo testirali vseh 135 vzorcev. Od tega smo pri 19/135 (14,1 %) vzorcih dokazali DNA *B. burgdorferi* sensu lato (preglednica 14). Pozitivne rezultate s to metodo smo dobili le v 10/33 vzorcih kolenskega punktata (30,3 %) in 9/42 kože (21,4 %).

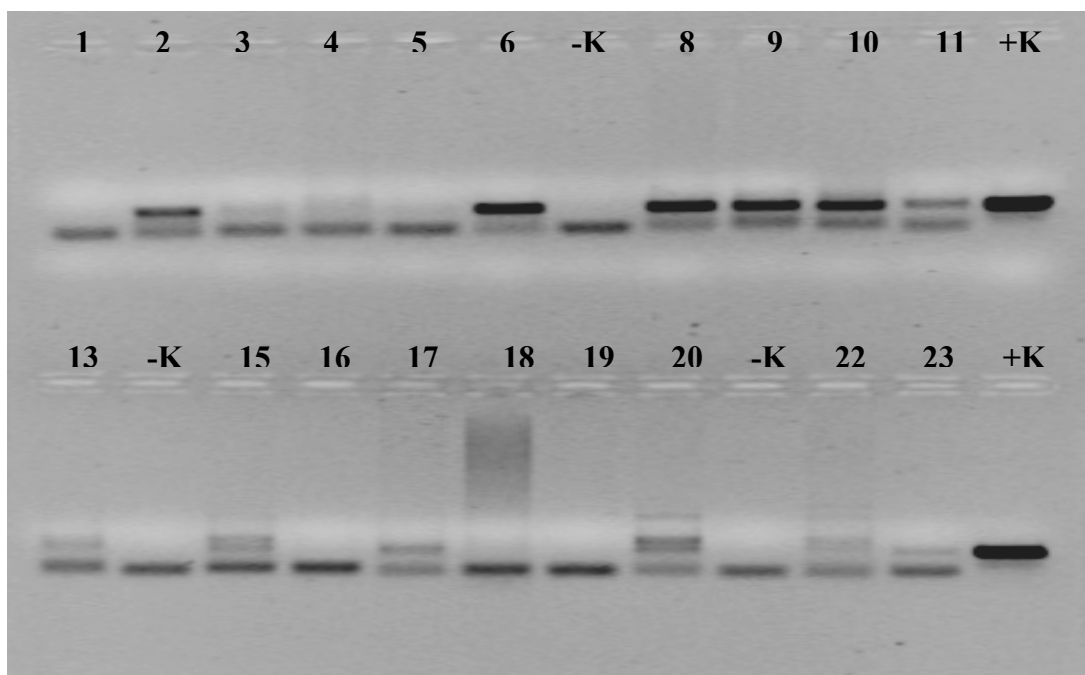
Preglednica 14: Rezultati po opravljenem pomnoževanju gena za OspA *B. burgdorferi* sensu lato z dvostopenjsko vgnezdno PCR v različnih vrstah vzorcev.

Dokaz prisotnosti gena za OspA	KUŽNINA					SKUPAJ
	Likvor	Koža	Kolenski punktata	Kri	Ostalo*	
Pozitivni	0 (0 %)	9 (21,4 %)	10 (30,3 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	19 (14,1 %)
Negativni	52 (100 %)	33 (78,6 %)	23 (69,7 %)	5 (100 %)	3 (100 %)	116 (85,9 %)
SKUPAJ	52	42	33	5	3	135

* po en vzorec očesne vodice, očesne steklovine ter košček sinovijske membrane

4.2 DOLOČANJE *B. burgdorferi* sensu lato V HUMANIH VZORCIH S POMNOŽEVANJEM IN DOKAZOM MEDGENSKEGA ODSEKA 5S-23S (rrf-rrl) Z ENOSTOPENJSKO RAZLIČICO VGNEZDENE PCR

Primer dokazovanja nastalega produkta po pomnoževanju tarčne sekvence 5S-23S prikazuje slika 11. Nastali PCR produkt posameznega vzorca smo primerjali s produktom, ki je nastal pri pomnoževanju odseka standardnih sevov kompleksa *B. burgdorferi* sensu lato.



Slika 11: Dokazovanje 226 - 256 bp velikega odseka 5S-23S po končanem pomnoževanju pri 19 vzorcih, treh negativnih in dveh pozitivnih kontrolah

[2, 6, 8-10 - močno pozitivni vzorci (veliko PCR-pridelka); 3-5, 11, 13, 15, 17, 20, 22-23 – slabo pozitivni vzorci (malo PCR-pridelka); 1, 16, 18-19 - negativni vzorci; + K – pozitivna kontrola (12, 24 - *B. afzelii* = 5,88 ng/μl); -K – negativna kontrola (7, 14, 21 - voda)]

S to metodo smo prisotnost medgenskega odseka 5S-23S (rrf-rrl) *B. burgdorferi* sensu lato dokazali pri 34/135 (25,2 %) vzorcih (glej preglednico 15). Največ pozitivnih vzorcev smo dobili med kolenskimi punktati 19/33 (57,6 %) in v vzorcih kože 13/42 (31,0 %). Le po en pozitiven vzorec smo dobili med vsemi testiranimi likvorji 1/52 (1,9 %) in vzorci krvi 1/5 (20,0 %).

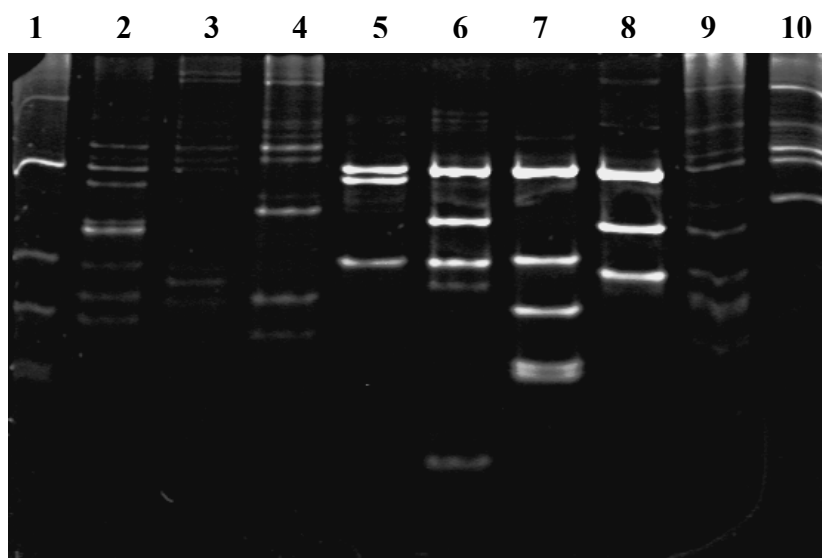
Preglednica 15: Rezultati po opravljenem pomnoževanju medgenskega odseka 5S-23S (rrf-rrl) *B. burgdorferi* sensu lato z enostopenjsko vgnezdjeno PCR v različnih vrstah vzorcev.

Dokaz prisotnosti medgenskega odseka 5S-23S	KUŽNINA					SKUPAJ
	Likvor	Koža	Kolenski punkt	Kri	Ostalo*	
Pozitivni	1 (1,9 %)	13 (31,0 %)	19 (57,6 %)	1 (20,0 %)	0 (0,0 %)	34 (25,2 %)
Negativni	51 (98,1 %)	29 (69,0 %)	14 (42,4 %)	4 (80,0 %)	3 (100,0 %)	101 (74,8 %)
SKUPAJ	52	42	33	5	3	135

* po en vzorec očesne vodice, očesne steklovine ter košček sinovijske membrane

4.2.1 Encimska restrikcija PCR-pridelkov medgenskega odseka 5S-23S (rrf-rrl) *B. burgdorferi* sensu lato, dobljenih z enostopenjsko različico vgnezdene PCR

Vse pozitivne vzorce, ki smo jih zbrali s pomnoževanjem medgenskega odseka 5S-23S, smo razrezali z *MseI* endonukleazo. Po restrikciji so se fragmenti različnih velikosti s potovanjem po poliakrilamidnem gelu med seboj ločili v vrstno značilnih razdaljah. Glede na vzorec, ki so ga fragmenti oblikovali v gelu, smo lahko določili vrsto borelije (slika 12).



Slika 12: Vzorce encimske razgradnje medgenskega odseka 5S-23S z endonukleazo *MseI* pri 10 vzorcih enostopenjske vgnezdene PCR

[1, 3-4, 10 – neznačilni vzorce encimskega rezanja; 2 – mešanica *B. afzelii* in *B. garinii*; 9 – sum na *B. spielmanii* (za popolno potrditev in ločitev te vrste od *B. afzelii* bi elektroforeza morala potekati več kot le 2 h); 5-8 – značilni vzorce restrikcije za sledeče borelijske vrste: 5 – *B. garinii*, 6 – *B. afzelii*, 7 – *B. burgdorferi* sensu stricto, 8 – *B. spielmanii*]

Med pozitivnimi vzorci enostopenjske vgnezdene PCR smo vrsto lahko določili pri 21 od 34 vzorcih (60,0 %). Kot je prikazano v preglednici 16, je bila v vzorcih največkrat določena vrsta *B. afzelii* [10/34 (29,4 %)], za njo *B. garinii* [5/34 (14,7 %)] in v enem primeru celo *B. burgdorferi* sensu stricto [1/34 (2,9 %)]. Pri 5/34 (14,7 %) pozitivnih vzorcih smo na poliakrilamidnem gelu sočasno opazili prisotnost dveh vrst borelij, *B. afzelii* in *B. garinii*. Preostalih 13 od 34 pozitivnih vzorcih vrste nismo določili, saj so bili dobljeni fragmenti na restrikcijskem gelu v primerjavi z razporeditvijo znanih fragmentov borelijskih vrst neznačilni. Neznačilne vzorce restrikcije smo največkrat določili v vzorcih kolenskega punktata, sledijo vzorci kože. Nadaljnih analiz vzorcev nismo naredili.

Tako v vzorcih kože kot kolenskega punktata smo na gelu večinoma razbrali vzorec fragmentov, ki je značilen vrsti *B. afzelii*.

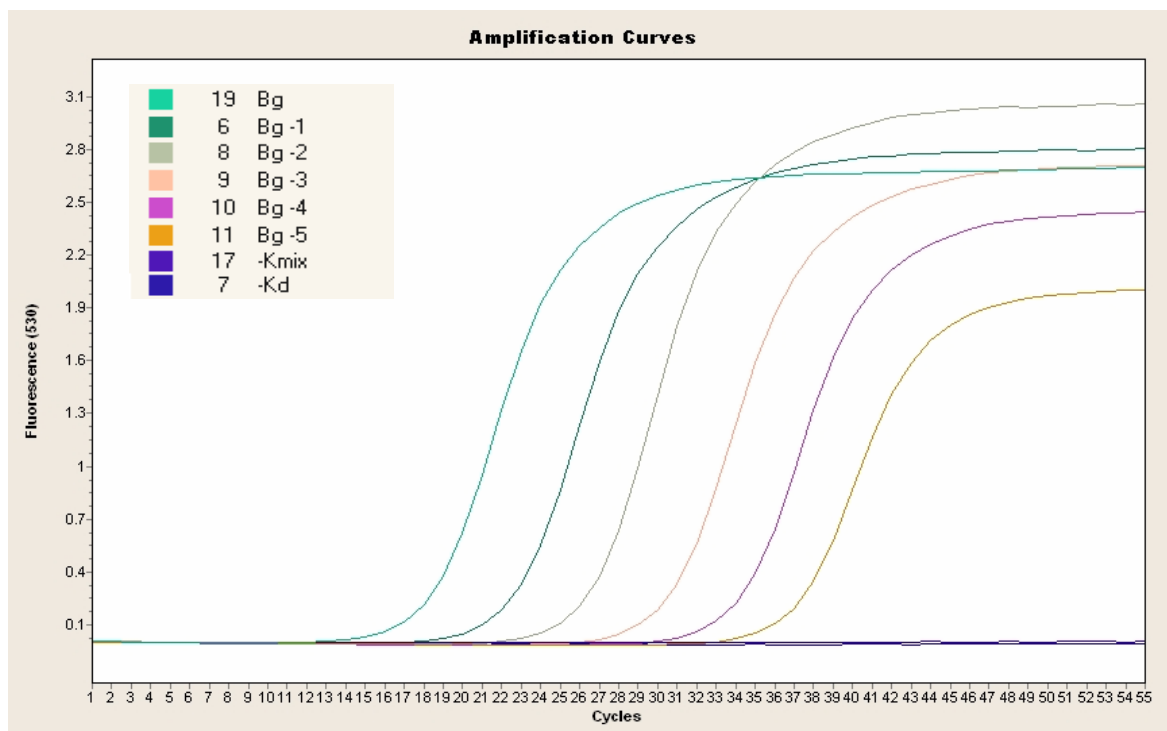
Preglednica 16: Vrste določene po restrikciji medgenskih odsekov 5S-23S (rrf-rrl) *B. burgdorferi* sensu lato po končanem pomnoževanju z enostopenjsko vgnezdeno PCR.

Določitev vrste po restrikciji z <i>MseI</i>	KUŽNINA					SKUPAJ
	Likvor	Koža	Kolenski punktata	Kri	Ostalo*	
<i>B. garinii</i>	/	2	3	/	/	5
<i>B. afzelii</i>	/	5	5	/	/	10
<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto	/	/	1	/	/	1
<i>B. garinii</i> + <i>B. afzelii</i>	/	3	2	/	/	5
Neznačilen vzorec restrikcije	1	3	8	1	/	13
SKUPAJ	1	13	19	1	/	34

* po en vzorec očesne vodice, očesne steklovine ter košček sinovijske membrane

4.3 DOLOČANJE DELA GENA ZA FLAGELIN *B. burgdorferi* sensu lato V HUMANIH VZORCIH S POMNOŽEVANJEM IN DOKAZOM V REALNEM ČASU

Sočasno pomnoževanje in dokazovanje PCR-pridelka pri PCR v realnem času je prikazano na sliki 13. Slika prikazuje naraščanje PCR-pridelka pri standardnem sevu *B. garinii*, ki smo ga serijsko 10-kratno redčili do redčitve razmerja 1 : 10.0000 (10^{-5}). Z večanjem redčitve se je temu primerno tudi pomnoževanje in kopičenje produkta začelo v kasnejših ciklih.



Slika 13: Krivulja pomnoževanja flagelinskega gena različnih redčitev vrste *B. garinii* v realnem času

[Bg – *B. garinii* = 6,72 ng/μl; Bg [-1, -2, -3, -4, -5] – redčitve znane borelijske vrste: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} ; -K mix = negativna kontrola kontaminacije pri pripravi reakcijske mešanice; -K d = negativna kontrola kontaminacije pri dodajanju izolirane DNA znane vrste]

Po testiranju vseh 135 rutinskih vzorcev na aparaturi LightCycler 2.0 smo po pregledu rezultatov skupno zbrali 27 (20,0 %) pozitivnih vzorcev in 108 (80,0 %) negativnih (preglednica 17). Večina pozitivnih kužnin je bila s to metodo odkritih med vzorci kože [14/42 (33,3 %) in vzorci kolenskega punktata [7/33 (21,2 %)]. S to metodo smo dobili tudi največ pozitivnih vzorcev likvorja [5/52 (9,6 %)].

Preglednica 17: Rezultati po pomnoževanju dela gena za flagelin *B. burgdorferi* sensu lato v realnem času v različnih vrstah vzorcev.

Dokaz prisotnosti dela gena za flagelin	KUŽNINA					SKUPAJ
	Likvor	Koža	Kolenski punkt	Kri	Ostalo*	
Pozitivni	5 (9,6 %)	14 (33,3 %)	7 (21,2 %)	1 (20,0 %)	0 (0,0 %)	27 (20,0 %)
Negativni	47 (90,4 %)	28 (66,7 %)	26 (78,8 %)	4 (80,0 %)	3 (100,0 %)	108 (80,0 %)
SKUPAJ	52	42	33	5	3	135

* po en vzorec očesne vodice, očesne steklovine ter košček sinovijske membrane

4.4 PRIMERJAVA SKLADNOSTI REZULTATOV MED POSAMEZNIMI RAZLIČICAMI PCR

Primerjava obeh različic vgnezdene PCR, pri katerih smo dokazovali prisotnost različnih delov DNA *B. burgdorferi* sensu lato je pokazala, da so se rezultati ujemali v 110/135 vzorcih (81,5 %) (preglednica 18). Obe metodi sta imeli po 14/135 pozitivnih (10,4 %) in 96/135 negativnih rezultatov (71,1 %). Neujemanja so se pojavila pri 25/135 vzorcih, kar je 18,5 %. Večina neskladnih rezultatov, kot kaže preglednica 18, je negativnih z vgnezdeno PCR za dokaza gena za OspA in pozitivnih z vgnezdeno PCR za dokaz medgenskega odseka 5S-23S.

Preglednica 18: Skladnost enostopenjske in dvostopenjske vgnezdene PCR za dokazovanje DNA *B. burgdorferi* sensu lato.

		Enostopenjska vgnezdena PCR (medgenski odsek 5S-23S)	
		Pozitivni	Negativni
Dvostopenjska vgnezdena PCR (gen za ospa)	Pozitivni	14 (10,4 %)	5 (3,7 %)
	Negativni	20 (14,8 %)	96 (71,1 %)

V preglednici 19 so prikazani rezultati ujemanja PCR v realnem času, s katerim se je pomnoževal del gena za flagelin, in dvostopenjske različice vgnezdene PCR, ki je

pomnoževala gen za OspA *B. burgdorferi* sensu lato. Skupna skladnost pozitivnih in negativnih rezultatov obeh različic PCR je 117/135 (86,7 %). Največ primerov neujemanj je takšnih, da s PCR v realnem času dobimo pozitiven rezultat, z dvostopenjsko vgnezdno PCR pa negativnega, kar je razvidno iz razpredelnice 19.

Preglednica 19: Skladnost pomnoževanja s PCR v realnem času in z dvostopenjsko vgnezdno PCR za dokazovanje DNA *B. burgdorferi* sensu lato.

		PCR v realnem času (gen za flagelin)	
		Pozitivni	Negativni
Dvostopenjska vgnezdna PCR (gen za ospa)	Pozitivni	14 (10,4 %)	5 (3,7 %)
	Negativni	13 (9,6 %)	103 (76,3 %)

Zadnja primerjava, ki smo jo naredili, je primerjava med PCR v realnem času, ki je pomnoževal del gena za flagelin, in enostopenjsko različico vgnezdene PCR, s katero smo pomnoževali medgenski odsek 5S-23S DNA *B. burgdorferi* sensu lato (preglednica 20). Delež skladnosti pozitivnih in negativnih rezultatov je 100/135 (74,0 %). Pri večini (21/35) neujemanj je enostopenjska vgnezdna PCR pomnoževala svoj tarčni gen, medtem ko ga PCR v realnem času ni.

Preglednica 20: Skladnost pomnoževanja s PCR v realnem času in z enostopenjsko vgnezdno PCR za dokazovanje DNA *B. burgdorferi* sensu lato.

		Enostopenjska vgnezdna PCR (medgenski odsek 5S-23S)	
		Pozitivni	Negativni
PCR v realnem času (gen za flagelin)	Pozitivni	13 (9,6 %)	14 (10,4 %)
	Negativni	21 (15,6 %)	87 (64,4 %)

4.5 PRIMERJAVA SKLADNOSTI REZULTATOV VSEH TREH RAZLIČIC PCR ZA POMNOŽEVANJE DNA *B. burgdorferi* sensu lato

Rezultati v preglednici 21 prikazujejo, da se rezultati vseh treh metod pomnoževanja različnih odsekov borelijske DNA skupno ujemajo v 71,1% primerih. Od tega je 7,4 % pozitivnih in 63,7 % negativnih rezultatov. Delež neujemanj predstavlja 28,9 % in pri primerjavi le dveh metod variira med 13,3 in 26,0 % .

Preglednica 21: Ujemanja in neujemanja rezultatov vseh treh različic PCR za dokazovanje DNA *B. burgdorferi* sensu lato.

Skladnost vseh treh PCR metod		Delež
Nivo UJEMANJA	Pozitivni	10 (7,4 %)
	Negativni	86 (63,7 %)
Nivo NEUJEMANJA		39 (28,9 %)

Preglednica 22 nam prikazuje vse možne kombinacije pozitivnih in negativnih rezultatov PCR ter njihov delež. Deleži vzorcev, ki so imeli pri dveh različicah PCR pozitiven rezultat se med vsemi primerjanimi pari bistveno ne razlikujejo (3-4 %). Izstopajoči rezultati so pri vzorcih, kjer smo le z eno od treh različnih protokolov PCR dobili pozitiven rezultat. Največ takih primerov smo zabeležili pri dvostopenjski vgnezdni PCR (12,6 %) in PCR v realnem času (7,4 %).

Preglednica 22: Pregled dobljenih rezultatov z vsemi tremi različicami PCR za dokazovanje DNA *B. burgdorferi* sensu lato.

Različice PCR			Št. vzorcev (delež)
Enostopenjska vgnezdjena PCR	Dvostopenjska vgnezdjena PCR	PCR v realnem času	
+	+	+	10 (7,4 %)
-	-	-	86 (63,7 %)
+	+	-	4 (3,0 %)
+	-	+	4 (3,0 %)
-	+	+	3 (2,2 %)
+	-	-	1(0,7 %)
-	+	-	17 (12,6 %)
-	-	+	10 (7,4 %)
SKUPAJ			135

4.6 TRAJANJE VSEH TREH RAZLIČIC PCR OD POSTOPKA IZOLACIJE DNA *B. burgdorferi* sensu lato DO KONČNEGA REZULTATA

Preglednica 23 nam prikazuje skupen čas, ki ga potrebujemo za posamezen protokol PCR, da pridemo do končnega rezultata. Najmanj časa potrebujemo kadar borelije dokazujemo s PCR v realnem času (3 do 4 ure), največ pa kadar je uporabljena enostopenjska vgnezdjena PCR (10 do 11 ur).

Preglednica 23: Čas potreben za postopke od začetka izolacije DNA *B. burgdorferi* sensu lato do dobljenega končnega rezultata.

Različice PCR	Čas potreben za različne postopke				SKUPNI ČAS
	Izolacija DNA*	Priprava reakcijske mešanice in vnos izolirane DNA	Čas pomnoževanja	Elektroforeza in dokazovanje PCR-pridelka	
Enostopenjska vgnezdjena PCR	1 h 40 min → 2 h 20 min	30 min	7 h 15 min	30 min	10 h → 11 h
Dvostopenjska vgnezdjena PCR	1 h 40 min → 2 h 20 min	2 x 30 min	2 x 2 h 30 min	30 min	8 h → 9 h
PCR v realnem času	1 h 40 min → 2 h 20 min	30 min	1 h		3 h → 4 h

* čas izolacije je odvisen od kužnine (tkivo / telesna tekočina)

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Borelije lymške borelioze s svojo prisotnostjo v človeku lahko povzročijo številne težave. Znano je, da so v veliki večini to poškodbe kože, lahko pa tudi živčnega sistema, sklepov in srca. Praviloma je potrebna mikrobiološka potrditev okužbe, razen v primeru kožne spremembe erythema migrans, ki je značilna le za borelijsko okužbo (Stanek in Strle, 2003; Wilske in sod., 2007).

»Zlati« standard med mikrobiološkimi metodami za diagnozo lymške borelioze kljub svojim pomanjklivostim ostaja kultivacija *B. burgdorferi* sensu lato (Strle, 1999c; Zore in sod., 2002; Wilske in sod., 2007). Njena šibkost je predvsem kompleksna sestava gojišča, visoka cena, časovna zamudnost (tudi do 12 tednov) in nizka občutljivost v telesnih tekočinah, kot so likvor, sinovijska tekočina in kri (Aguero-Rosenfeld in sod., 2005). Metoda je v veliko pomoč pri bolnikih, katerim klinična slika kljub odsotnosti specifičnih protiteles kaže znake borelijske okužbe (Wilske in sod., 2007). V rutinski diagnostiki so običajno uporabljene serološke metode, s katerimi dokazujemo prisotnost odzivnih specifičnih protiteles v serumu, likvorju in sklepni tekočini bolnika (Aguero-Rosenfeld in sod., 2005). Prednosti seroloških metod so lahka dostopnost testov, hitre in poceni metode. Splošen problem takšnega testiranja pa je nizka občutljivost testov pri zgodnji lymški boreliozi (Rosa in sod., 1998; Postic in sod., 2002; Stanek in Strle, 2003; Wilske in sod., 2007). Poleg naštetih metod se v laboratorijsko diagnostiko uspešno vključuje tudi molekularno dokazovanje DNA odsekov *B. burgdorferi* sensu lato, pri katerem se za diagnozo uporabljajo kužnine, kot so bioptični vzorci kože, kolenski punktati, serum, likvor in druge telesne tekočine človeka.

V tej diplomski nalogi smo si za dokaz *B. burgdorferi* sensu lato izbrali metodo PCR za pomnoževanje dobro poznanih DNA odsekov. Metoda velja za zelo specifično in občutljivo. Predpogoj za uspešno pomnoževanje je predhodno dobro poznavanje nukleotidnega zaporedja vsaj enega dela genoma bakterije, ki vpliva na izbiro tarčne sekvence, sestavo oligonukleotidnih začetnikov in sonde. Poleg tega moramo poskrbeti, da reakcija pomnoževanja poteka v optimalnih pogojih, ki jih zagotovimo z ustrezno

koncentracijo reagentov v reakcijski mešanici, avtomatsko nastavitvijo optimalnih temperatur znotraj enega cikla in z ustreznim številom ciklov (Poljak in sod., 1994).

Izbrali smo si dve metodi oz. tri različice metode PCR, ki potekajo po istem principu, razlikujejo se v načinu izvedbe, izbiri tarčnih sekvenc, številu parov začetnih oligonukleotidov, trajanju ter načinu dokazovanja nastalega PCR-pridelka. Izbrali smo si dva različna protokola vgnezdene PCR (dvostopenjsko za dokazovanje plazmidnega gena *ospA* in enostopenjsko za odkrivanje kromosomskega odseka 5S-23S) in PCR v realnem času z enim parom začetnikov, s katero smo ugotavljali prisotnost flagelinske sekvence, značilne le za borelije. Naš cilj je bil oceniti uspešnost pomnoževanja, ugotoviti, katera od preiskovanih metod je občutljivejša in katera bolj uporabna pri vsakdanjem delu ter ugotoviti, katera od izbranih tarčnih zaporedij bi lahko bila najustreznejša za dokazovanje prisotnosti borelij lysmske borelioze. Predvsem smo želeli ovrednotiti pomen PCR v realnem času v primerjavi s tradicionalno izvedbo PCR, kot je vgnezdena PCR.

Vse zbrane rutinske vzorce bolnikov smo testirali z dvostopenjsko in enostopenjsko vgnezdeno PCR, kjer smo uporabili dva para oligonukleotidnih začetnikov, ter s PCR v realnem času, pri kateri smo dodali le en par začetnikov, kar ustreza klasičnemu PCR. Ne moremo trditi, da PCR z dvema začetnima oligonukleotidoma učinkoviteje pomnožuje, saj je bilo število pozitivnih vzorcev pri PCR v realnem času [27/135 (20,0 %)] v primerjavi z enostopenjsko vgnezdeno PCR manjše [34/135 (25,2 %)], v primerjavi z dvostopenjsko pa večje [19/135 (14,1 %)]. Rezultate prikazujejo preglednice 17, 15, 14.

S preučevanjem, katera izmed izbranih tarčnih sekvenc bi bila lahko najustreznejša, so nam rezultati pokazali na kromosomski odsek 5S-23S, ki je bil pomnoževan z enostopenjsko vgnezdeno PCR. Ta odsek je za borelije edinstven in hkrati nenavaden zaradi dvojne kopije *rrl* (23S) in *rrf* (5S), ki sta tandemsko razporejeni, in odseka med njimi (Schwartz, 1992; Davidson, 1992; Wang in sod., 1999). Poleg tega so ribosomski geni izredno ohranjeni in niso tako močno podvrženi evolucijskim spremembam. Tudi flagelinska sekvenca je prisotna na kromosomu. Slabost zanjo je, da imajo odseki flagelina lahko podobno ali celo identično strukturo s flagelinom drugih gibljivih bakterij (npr. treponeme, enterobakterije, bacilov) (Barbour in Hayes, 1986; Wilske in sod., 1988; Ružič-Sabljić, 2006). To pomeni, da je izbrani gen v primerjavi z genskim odsekom, kot je

5S-23S, in genom za beljakovino OspA borelijsko manj specifičen. Vsekakor je vrstno najbolj specifičen in poleg tega najbolj heterogen tarčni gen *ospA*, ki se za razliko od 5S-23S in flagelinske sekvence razlikuje po mestu zapisa. Zapis zanj leži na plazmidu in je prisoten pri skoraj vseh izolatih *B. burgdorferi* sensu lato. Njegova heterogenost je po vsej verjetnosti razlog, da se med vrstami razlikuje po velikosti in je včasih nemogoče dokazati njegovo izražanje (Wang in sod., 1999). OspA beljakovina je bila tarča prve identifikacije borelij. Pripravili so veliko različnih monoklonskih protiteles in z njihovo pomočjo opredelili borelijske izolate. Šele z razvojem molekularne diagnostike so borelije opredelili tako, da so se serotipi borelij ujemali z določenimi genotipi (Wilske in sod., 1993).

Eden glavnih ciljev diplomske naloge je bilo ugotoviti, katera izmed različic PCR je občutljivejša in katera bolj uporabna v vsakdanji praksi. Izkazalo se je, da vgnezdena PCR res poveča število pomnoženih PCR-pridelkov in s tem občutljivost dokazovanja, če je le tarčna sekvenca dovolj značilna za borelije lysmske borelioze in dovolj heterogena, da ne prikaže lažno negativnih rezultatov. Drugi dejavnik, ki bi lahko vplival na občutljivost primerjanih različic PCR, je dokazovanje PCR-pridelkov. Pri enostopenjski in dvostopenjski vgnezdjeni PCR smo prisotnost nastalega PCR-pridelka ugotavljali po končani elektroforezi v gelu, obarvanem z etidijevim bromidom. Opazili smo, da je bila fluorescentna bendov ponekod šibeka in drugod močna, na kar je vplivala količina nastalega PCR-produkta med reakcijo. Edina prednost dokazovanja PCR-pridelkov v gelu je, da s standardnim sevom lahko primerjamo približno velikost in ocenimo specifičnost PCR-pridelka. Za pridelke, pomnožene v sistemu kapilar, s PCR v realnem času velikosti, drugače kot z gelsko elektroforezo, ne moremo določiti, za to pa je potrebno kapilare odpreti. Kljub temu pa je velika prednost PCR v realnem času, da signala PCR- pridelka ne odčitavamo sami, saj za to poskrbi računalnik sam. Poleg tega lahko povečevanje in nastajanje novih PCR-pridelkov ves čas spremljamo na računalniškem zaslonu in po končanem pomnoževanju zato dodatno dokazovanje PCR-pridelkov ni potrebno. Obstaja tudi možnost, da ocenimo približno koncentracijo borelijske DNA v vzorcu. Takšno oceno bi lahko podali s primerjavo krivulj vzorcev in različno redčenih kontrol, kot nam prikazuje slika 13. Zanimali bi nas predvsem cikli, v katerih se je tarčna sekvenca pričela pomnoževati. Zelo zaželjeno pa bi bilo s to metodo določiti tudi vrsto *B. burgdorferi* sensu lato v kužnini, vendar identifikacije vrste na flagelinskem genu do sedaj niso objavili.

Prednost PCR v realnem času je tudi v tem, da v primerjavi z ostalimi protokoli PCR od postopka izolacije do končnega rezultata pridemo v 3 do 4 urah (preglednica 23). Po trajanju postopka sledi dvostopenjska vgnezdna PCR (8 do 9 ur), vendar je pri tem potrebno upoštevati, da ima ta različica vgnezdene PCR vmesno stopnjo, ki vključuje prenos PCR-pridelka iz ene stopnje v drugo. Zato je iz takšnega vidika bolj enostavna enostopenjska vgnezdna PCR, ki sicer od izolacije do končnega rezultata potrebuje največ časa (kar 10 do 11 ur), a jo kljub temu lahko pustimo trajati čez noč.

Pri analizi rezultatov so si kužnine pozitivnih vzorcev sledile po sledečem zaporedju: kolenski punktati, koža, likvor in kri. Z enostopenjsko in dvostopenjsko vgnezdno PCR smo največ pozitivnih rezultatov dobili v kolenskih punktatih (57,6 % in 30,3 %, posamično), sledili so bioptični vzorci kože (31,0% in 21,4 %, posamično). Ravno obratno razporeditev so pokazali rezultati PCR v realnem času, kjer je bilo več pozitivnih rezultatov v vzorcih kože (33,3 %) in manj v vzorcih kolenskega punktata (21,2 %). Razlika te metode od obeh protokolov vgnezdene PCR je tudi število pozitivnih vzorcev likvorja. S PCR v realnem času je bilo pozitivnih 9,6 %, z enostopenjsko vgnezdno PCR pa 1,9 %, medtem ko z dvostopenjsko vgnezdno PCR v teh vzorcih nismo uspeli dokazati *B. burgdorferi* sensu lato. Za razliko od dvostopenjske vgnezdene PCR sta enostopenjska vgnezdna PCR in PCR v realnem času zaznali navzočnost *B. burgdorferi* sensu lato vsaka v enem vzorcu bolnikove krvi. Ravno zato bi bilo zaželeno po končanem PCR postopku določiti vrsto borelij, s čimer bi potrdili, da smo resnično pomnoževali borelijsko DNA in istočasno etiološko opredelili povzročitelja bolezni.

Največ primerov lymške borelioze (80 %) se izraža s prizadetostjo in spremembami kože (Steere, 2001; Stanek in Strle, 2003). V Sloveniji je znano, da jo povzročajo vsaj štiri vrste borelij: *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi* sensu stricto in *B. spielmanii* (Ružič-Sabljić, 2002 in 2006). Vseeno so pri bolnikih z erythema migrans v večini primerov izolirali *B. afzelii* (Picken in sod., 1997; Picken in sod., 1998; Ružič-Sabljić in sod., 2002), *B. garinii* so največkrat zasledili kot povzročiteljico okvare živčevja in *B. burgdorferi* sensu stricto okvare sklepov (Cimmino in sod., 1998; Nadelman in Wormser, 1998; Strle, 2006; Humair in Gern, 2000). Ugotavljanja našega raziskovanja v celoti ne podpirajo dejstev, ki jih ponuja literatura. Med vzorci, pri katerih smo pomnoževali kromosomsko

rrf-rrl regijo (5S-23S), in pozitivne med njimi razrezali s specifično endonukleazo *MseI*, smo ugotovili, kot je prikazano v preglednici 16, da sta v kolenskem punktatu in koži najpogosteje navzoči vrsti *B. afzelii* in *B. garinii*. *B. afzelii* smo v kolenskem punktatu in koži dokazali v 15/34 vzorcih (44,1 %) (samostojno 5x v koži in 5x v kolenskem punktatu, skupaj z *B. garinii* pa 3x v koži in 2x v vzorcih kolenskega punktata). *B. garinii* je bila v primerjavi z *B. afzelii* dokazana v manjšem številu (10/34; 29,4 %). V koži je bila samostojno dokazana 2x in 3x skupaj z *B. afzelii*, v punktatih kolenske tekočine pa samostojno 3x in 2x z *B. afzelii*. Pogostejša prisotnost *B. afzelii* v koži je znana, manj znana pa je njena prisotnost v kolenskem punktatu. Vsaj v ZDA je vrsta *B. burgdorferi* sensu stricto najpogostejša povzročiteljica okvare sklepov. Kljub temu je bila ta vrsta z restrikcijo, ki smo jo izvedli, dokazana le v enem vzorcu kolenskega punktata (1/34; 2,9 %). *B. burgdorferi* sensu stricto je vrsta, ki so jo v Sloveniji pri ljudeh izolirali v manj kot 1 % (iz kožne spremembe erythema migrans). Poskusi izolacije iz kože pri drugih kliničnih oblikah okužbe, kot tudi iz likvorja, krvi, sinovijske tekočine ali drugih kužnin so precej manj uspešni (Ružič-Sabljić, 2006). Glavni etiološki povzročitelj lysmske borelioze v Sloveniji je *B. afzelii*, saj so jo s kultivacijo kože določili najpogosteje, za njo pa *B. garinii* (Zore in sod., 2002). Čisto vsi vzorci restrikcije v raziskavi le niso pokazali značilne razporeditve fragmentov, na podlagi katerih bi lahko določili vrsto borelij lysmske borelioze (slika 12). Takšnih vzorcev je bilo 13/34 (38,2 %). Neznačilnim vzorcem restrikcije, večina je bila določenih v kolenski punktatih, bi bilo potrebno določiti natančno nukleotidno zaporedje in jih opredeliti. Možno je, da se je pomnoževala DNA borelije ali pa njenega gostitelja (humana DNA). Tako veliko število nespecifičnih vzorcev restrikcije v določeni meri vzbudi dvom specifičnosti enostopenjske vgnezdene PCR in vsekakor nakazuje potrebo za nadaljnjo opredelitev teh vzorcev.

Primerjava kombinacij vseh treh metod je pokazala najvišje ujemanje rezultatov (86,7 %) pri dvostopenjski vgnezdni PCR in PCR v realnem času (preglednica 19). Pri večini rezultatov (9,6 % / 13,3 %), ki se niso ujemali, je bila dokazana prisotnost flagelinskega gena z PCR v realnem času, medtem ko gena za beljakovino OspA z vgnezdno PCR nismo dokazali. Razlog za takšen izid je skoraj verjetno visoka heterogenost plazmidnega gena *ospA* in s tem zmanjšana možnost vezave začetnih oligonukleotidov. Drugo mesto po deležu skladnih rezultatov (81,5 %) je bilo določeno pri obeh različicah vgnezdene PCR

(preglednica 18). Ponovno je bilo med neujemanji 14,8 % rezultatov takšnih, kjer plazmidnega gena *ospA* nismo dokazali kromosomski odsek 5S-23S pa. Vzrok za takšen izid je po vsej verjetnosti ravno tako kriva beljakovina OspA in njena spremenljivost. Najvišji nivo neujemanja med vsemi primerjavami (26,0 %) je bil določen med enostopenjsko vgnezdno PCR in PCR v realnem času. Obe metodi sta pomnoževali kromosomske odseke oz. dele genov, ki veljajo za močno konzervativne. Razliko si po eni strani razlagamo kot nespecifičnost enostopenjske vgnezdene PCR, ki je pomnoževala ribosomsko regijo *rrf-rrl* (5S-23S). Kljub temu, da ta odsek obravnavamo kot značilen za borelije lysmske borelioze, je možno, da ga najdemo bodisi enakega ali podobnega tudi pri DNA drugega izvora (npr. humana, klopná ali druge živalske vrste itd.) Nespecifičnost potrjujejo tudi rezultati restrikcije pozitivnih vzorcev, s katero smo ugotovili, da je imela dobra tretjina pozitivnih vzorcev (13/34; 38,2 %) določen neznačilen vzorec restrikcije. Druga razlaga s katero bi lahko pojasnili preostali delež neujemanj (10,4 %) teh dveh metod, je, da smo zaznali flagelinsko DNA sekvenco katere od drugih bakterij. Za borelije je značilen le sredinski del, drugi deli so več ali manj podobni. V teh 10,4 % neujemanj za borelije značilne dvojne kopije *rrl* (23S) in *rrf* (5S) nismo zaznali. Da bi se popolnoma razjasnili zaradi rezultatov, ki si niso bili skladni, bi morali vse raziskovanje nadaljevati v tej smeri.

Skupno ujemanje pomnoževanja treh različnih genov s tremi različnimi tehnikami prikazujeta preglednica 21 in 22. Prišli smo do ugotovitve, da pomnoževanje različnih tarčnih genov DNA vpliva na rezultat. Kako opazni so šibko pozitivni rezultati oz. količina PCR-pridelkov, je odvisno od števila borelij v prejeti kužnini v laboratorij, načinu pomnoževanja (en / dva para oligonukleotidnih začetnikov) in od dokazovanja PCR-pridelka (računalniška / s prostim očesom pod UV- lučjo). Tako raznoliki rezultati so odraz trenutno še vedno nestandardizirane tehnike direktnega dokazovanja.

5.2 SKLEPI

- Ne moremo trditi, da PCR z dvema začetnima oligonukleotidoma učinkoviteje pomnožuje borelijsko DNA kot PCR z enim parom začetnih oligonukleotidov.
- Pri preučevanju tarčnih sekvenc se je med izbranimi za najustreznejšo za pomnoževanje izkazala borelijsko edinstvena 5S-23S ribosomska sekvenca.
- Vgnezdena PCR res poveča občutljivost, če je le tarčna sekvenca dovolj močno značilna za borelije lymske borelioze in dovolj heterogena, da ne prikaže lažno negativnih rezultatov.
- Glede na trajanje diagnostičnega postopka je v veliki prednosti protokol PCR v realnem času, saj sta pomnoževanje tarčnega odseka in dokazovanje PCR-pridelkov končana v 1 uri.
- Primerjava kombinacij vseh treh protokolov je pokazala najvišje ujemanje rezultatov (86,7 %) pri dvostopenjski vgnezdni PCR in PCR v realnem času. Po deležu skladnih rezultatov (81,5 %) sledita obe različici vgnezdene PCR. Najvišji delež neujemanja med vsemi protokoli (26,0 %) je bil ugotovljen med enostopenjsko vgnezdno PCR in PCR v realnem času.
- Borelijsko DNA smo največkrat dokazali v vzorcih kolenskega punktata, najmanjkrat pa v likvorju in vzorcih krvi.
- S specifično endonukleazo *MseI* (po enostopenjski vgnezdni PCR) smo ugotovili, da sta v kolenskem punktatu in koži najpogosteje navzoči vrsti *B. afzelii* in *B. garinii*.
- Neznačilni vzorci restrikcije so bili najpogosteje določeni v vzorcih kolenskih punktata. PCR-pridelke pomnožene iz teh vzorcev bi morali nadalje preučiti z določitvijo nukleotidnega zaporedja, da bi lažje opredelili, ali se je pomnoževala borelijska DNA ali DNA njenega gostitelja.

6 POVZETEK

Lymška borelioza je zoonoza, ki jo na severni polobli prenašajo klopi. Njena pojavnost je endemična tam, kjer so prisotni klopi rodu *Ixodes*. V Evropi je najbolj razširjen *Ixodes ricinus*, ki je prenašalec povzročiteljice bolezni *B. burgdorferi* sensu lato. V Sloveniji je znano, da v sklopu kompleksa *B. burgdorferi* sensu lato bolezen povzročajo vsaj štiri vrste borelij: *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi* sensu stricto in *B. spielmanii*.

Namen naše naloge je bil primerjati dve različici molekularnega dokazovanja prisotnosti borelijske okužbe. V nalogi smo uporabili klinične vzorce bolnikov, zbrane za molekularno diagnostiko. V zbranih vzorcih smo po izolaciji s kompletom reagentov QIAamp® DNA MiniKit določevali tri različne tarčne sekvence (gen *ospA*, gen za flagelin in medgenski odsek 5S-23S), vsako z drugačnimi začetnimi oligonukleotidi in drugačnim protokolom PCR. Primerjali smo dva različna protokola vgnezdene PCR s PCR v realnem času. Ena izmed različic vgnezdene PCR je imela oba para začetnih oligonukleotidov ločena fizično, zato smo jo izvajali v dveh stopnjah, druga pa je imela pripenjanje oligonukleotidnih začetnikov ločene s temperaturo naleganja in se je lahko izvajala v enem koraku. PCR v realnem času je potekal po klasičnem načinu, le način detekcije in nevarnost kontaminacije sta bila drugačna.

Največji delež (25,2 %) pozitivnih PCR-pridelkov smo določili z enostopenjsko vgnezdeno PCR, kjer smo določevali medgenski odsek 5S-23S. V 20,0 % pozitivnih vzorcev smo zaznali flagelinsko sekvenco s PCR v realnem času, najmanjši delež pozitivnih vzorcev (14,1 %) pa je bilo dokazanih z dvostopenjsko vgnezdeno PCR, ki je za tarčo pomnoževanja imela gen *ospA*. Iz rezultatov ne moremo trditi, da različice vgnezdene PCR učinkoviteje pomnožujeta borelijsko DNA kot PCR v realnem času. Vgnezdena PCR v reakciji pomnoževanja že dodatno poveča količino nastalega PCR-pridelka, vendar je za dokazovanje okužbe z borelijami predvsem pomembna izbira zanje značilne in čimmanj heterogene sekvence. Med našim izborom je za ustreznost dokazovanja izstopala borelijsko značilna 5S-23S sekvenca, med metodami pa se je za bolj praktično in uporabno izkazala PCR v realnem času.

Po skladnosti rezultatov sta si bili najbližje dvostopenjska vgnezdna PCR in PCR v realnem času (86,7 %). Najbolj neprimerljivi različici PCR med vsemi kombinacijami (26,0%) pa sta bili enostopenjska vgnezdna PCR in PCR v realnem času.

Po končanem pomnoževanju z vsemi različnimi protokoli PCR smo ugotovili, da je bila borelijska DNA največkrat dokazana v vzorcih kolenskega punktata in koži. Po končani enostopenjski vgnezdni PCR smo z restrikcijo PCR-pridelkov v 29,4 % določili samo *B. afzelii*, v 14,7 % samo *B. garinii*, v 14,7 % smo ugotovili sočasno prisotnost obeh *B. afzelii* in *B. garinii* in le v enem vzorcu je bila dokazana *B. burgdorferi* sensu stricto. Veliko pozitivnih vzorcev (38,2 %) je imelo neznačilen restrikcijski vzorec.

Iz rezultatov je vidno, da pomnoževanje različnih tarčnih odsekov DNA vpliva na končen rezultat. Tako raznoliki rezultati, kot smo jih dobili mi, so odraz trenutno še vedno nestandardizirane tehnike direktnega dokazovanja.

7 VIRI

Aguero-Rosenfeld M. E., Nowakowski J., Bittker S., Cooper D., Nadelman R. B., Wormser G. P. 1996. Evolution of the serologic response to *Borrelia burgdorferi* in treated patients with culture-confirmed erythema migrans. *Journal of Clinical Microbiology*, 34, 1: 1-9

Aguero-Rosenfeld M. E., Wang G., Schwartz I., Wormser G. P. 2005. Diagnosis of Lyme borreliosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 18, 3: 483-509

Barbour A. G., Hayes S. F. 1986. Biology of *Borrelia* species. *Microbiological Reviews*, 50, 4: 381-400

Barbour A. G. 1998. Fall and rise of Lyme disease and other *Ixodes* tick-borne infections in North America and Europe. *British Medical Bulletin*, 54: 647–658

Baril C., Richaud C., Baranton G., Saint Girons I. S. 1989. Linear chromosome of *Borrelia burgdorferi*. *Research in Microbiology*, 140, 8: 507-516

Belaich S. 1995. Lyme disease. *Presse Médicale*, 24, 2: 81-87

Bergstroem S., Noppa L., Gylfe A., Oesterg Y. 2002. Molecular and cellular biology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. V: Lyme borreliosis: biology, epidemiology and control. 1st ed. Gray J., Kahl O., Lane R. S., Stanek G. (eds.). Wallingford, New York: CABI Publishing: 47-90

Brorson Ø., Brorson S. H. 1998. A rapid method for generating cystic forms of *Borrelia burgdorferi*, and their reversal to mobile spirochetes. *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, 106: 1131–1141

Burgdorfer W., Barbour A. G., Hayes S. F., Benach J. L., Grunwaldt E., Davis J. P. 1982. Lyme disease- A tick-borne spirochetosis? *Science*, 216: 1317-1319

Busch U., Nitschko H. 1999. Methods of the differentiation of microorganisms. *Journal of Chromatography B, Biomedical Sciences and Applications*, 722, 1-2: 263-278

Casjens S., Palmer N., van Vugt R., Mun H. W., Stevenson B., Rosa P., Lathigra R., Sutton G., Peterson J., Dodson R. J., Haft D., Hickey E., Gwinn M., White O., Fraser M. 2000. A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Molecular Microbiology*, 35, 10: 490-516

Charon N. W., Greenberg E. P., Koopman M. B. H., Limberger R. J. 1992. Spirochete chemotaxis, motility and the structure of the spirochetal periplasmic flagella. *Research in Microbiology*, 143: 597-603

Cimmino M., Granström M., Gray J. S., Guy E. C., O'Connell S., Stanek G. 1998. European Lyme borreliosis clinical spectrum. *Zentralblatt für Bakteriologie*, 287: 248-252

Davidson B. E., MacDougall J., Saint Girons I. 1992. Physical map of the linear chromosome of the bacterium *Borrelia burgdorferi* 212, a causative agent of Lyme disease, and localization of rRNA genes. *Journal of Bacteriology*, 174, 11: 3766–3774

de Silva A. M., Fikring E. 1997. Arthropod – and host – specific gene expression by *Borrelia burgdorferi*. *Journal of Clinical Investigation*, 99, 3: 377-379

Edlow J. A. 1999. Lyme disease and related tick-borne illnesses. *Annals of Emergency Medicine*, 33: 680–693

Eisen L. 2002. Vectors of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. V: Lyme borreliosis: biology, epidemiology and control. Gray J., Kahl O., Lane R. S., Stanek G. (eds.). Wallingford, CABI Pub: 91-115

Fernández J. G., Fernández M. R., Murillo F. N., del Carmen Maroto Vela M. 1997. Antigenic and genetic structure of *Borrelia burgdorferi*. *Microbs*, 91: 165-174

Fikrig E., Telford S. R., Barthold S. W., Kantor F. S., Spielman A., Flavell R. A. 1992. Elimination of *Borrelia burgdorferi* from vector ticks feeding on OspA-immunized mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 12: 5418-5421

Fingerle V., Rauser S., Hammer B., Kahl O., Heimerl C., Schulte-Spechtel U., Gern L., Wilske B. 2002. Dynamics of dissemination and outer surface protein expression of different European *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains in artificially infected *Ixodes ricinus* nymphs. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 4: 1456-1463

Fraser C. M., Casjens S., Huang W. M., Sutton G. G., Clayton R., Lathigra R., White O., Ketchum K. A., Dodson R., Hickey E. K., Gwinn M., Dougherty B., Tomb J. F., Fleischmann R. D., Richardson D., Peterson J., Kerlavage A. R., Quackenbush J., Salzberg S., Hanson M., van Vugt R., Palmer N., Adams M. D., Gocayne J., Venter J. C. 1997. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature*, 390: 580-586

Funa A., Šavs T., Škgat S. 1996. Kako dolgo imajo bolniki z erythema migrans prisesane klope. *Medicinski razgledi*, 35: 297-307

Gerber M. A., Shapiro E. D., Burke G. S., Parcels V. J., Bell G. L. 1996. Lyme disease in children in southeastern Connecticut. Pediatric lyme disease study group. *New England Journal of Medicine*, 335: 1270–1274

Gern L., Burgdorfer W., Aeschlimann A., Krampitz H. E. 1993. The ecology of Lyme borreliosis in Europe. V: Aspect of lyme borreliosis. Weber K., Burgdorfer K. (eds.). Berlin, Springer-Verlag: 59-69

Glöckner G., Lehmann R., Romualdi A., Pradella S., Schulte-Spechtel U., Schilhabel M., Wilske B., Sühnel J., Platzner M. 2004. Comparative analysis of the *Borrelia garinii* genome. *Nucleic Acids Research*, 32, 20: 6038-6046

Granström M. 1997. Tick-borne zoonoses in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, 3: 156-169

Herzog-Velikonja B., Gruden K., Pašič L. 2001. Praktikum iz molekularne biologije. Ljubljana, Študentska založba: 59-65

Hinnebusch J., Barbour A. G. 1992. Linear- and circular-plasmid copy numbers in *Borrelia burgdorferi*. *Journal of Bacteriology*, 174, 16: 5251-5257

Holt J. G., Krieg N. R., Sneath P. H. A., Staley J. T., Williams S. T. 1994. The spirochetes. V: Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th ed. Holt J. G., Krieg N. R., Sneath P. H. A., Staley J. T., Williams S. T. (eds.). Baltimore, Williams & Wilkins Comp.: 27-37

Humair P. F., Gern L. 2000. The wild hidden face of Lyme borreliosis in Europe. *Microbes and Infection*, 2: 915-922

Innis M. A., Gelfand D. H. 1990. Optimization of PCR. V: PCR protocols: a guide to methods and applications. Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J. (eds.) San Diego, California, Academic Press, Inc.: 3-12

Jaenson T. G. T. 1999. The reservoir host of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe. V: Acarology. 9th ed. Needham G. R., Horn D. J., Welbourn W. C. (eds.) Ohio, United States of America, Columbus, 2: 409-414

Klempner M. S., Huber B. T. 1999. Is it thee or me? – autoimmunity in Lyme disease. *Nature Medicine*, 5: 1346–1347

Kurtenbach K., Schäfer S. M., de Michelis S., Etti S., Sewell H. S. 2002. *Borrelia burgdorferi* sensu lato in the vertebrate host. V: Lyme borreliosis: biology, epidemiology and control. Gray J., Kahl O., Lane R. S., Stanek G. (eds.). Wallingford, CABI Pub: 117-148

Lagal V., Postic D., Ružić-Sabljić E., Baranton G. 2003. Genetic diversity among *Borrelia* strains determined by single-strand conformational analysis of the *ospC* gene and its association with invasiveness. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 11: 5059-5065

Lane R. S., Quistad G. B. 1998. Borreliacidal factor in the blood of the western fence lizard (*Sceloporus occidentalis*). *Journal of Parasitology*, 84: 29-34

Llop P., Bonaterra A., Peñalver J., Lopez M. M. 2000. Development of a highly sensitive nested-PCR procedure using a single closed tube for detection of *Erwinia amylovora* in asymptomatic plant material. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 5: 2071-2078

Logar J. 1999. Klopi in pršice (*Acarina*). V: Parazitologija v medicini. Logar J. (ur.). Ljubljana, DZS: 157-159

Logar M., Lotrič-Furlan S., Maraspin V., Cimperman J., Jurca T., Ružič-Sabljić E., Strle F. 1999. Has the presence or absence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato as detected by skin culture any influence on the course of erythema migrans? Wiener klinische Wochenschrift, 111, 22-23: 945–950

Lyme disease. 2005. Providence, Brown University: Department of vaccines and infectious disease (2005) http://www.brown.edu/Courses/Bio_160/Projects1999/projects.html (24.apr.2007): 1 str.

Mackay I. M. 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clinical Microbiology and Infection, 10: 190-212

Masuzawa T., Kurita T., Kawabata H., Yanagihara Y. 1994. Relationship between infectivity and OspC expression in Lyme disease *Borrelia*. FEMS Microbiology Letters, 123, 3: 319-324

Mathiesen M. J., Christiansen M., Hansen K., Holm A., Asbrink E., Theisen M. 1998. Peptide-based OspC enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of Lyme borreliosis. Journal of Clinical Microbiology, 36, 12: 3474-3479

Nadelman R. B., Wormser G. P. 1998. Lyme borreliosis. Lancet, 352: 557-565

Nucleo acid research facilities. 2007. Shanghai, China, Shanghai Shine Gene Molecular Biotech, Inc. (2003-2007) <http://www.shinegene.org.cn/service/serv001.html> (24.apr.2007): 1 str.

Ojaimi C., Brooks C., Casjens S., Rosa P., Elias A., Barbour A., Jasinskas A., Benach J., Katona L., Radolf J., Caimano M., Skare J., Swingle K., Akins D., Schwartz I. 2003. Profiling of temperature-induced changes in *Borrelia burgdorferi* gene expression by using whole genome arrays. Infection and Immunity, 71, 4: 1689-1705

Olsen I., Paster B. J., Dewhirst F. E. 1999. Taxonomy of spirochetes. Anaerobe, 6: 39-57

Paster B. J., Dewhirst F. E., Weisburg W. G., Tordoff L. A., Fraser G. J., Hespell R. B., Stanton T. B., Zablen L., Mandelco L., Woese C. O. 1991. Phylogenetic analysis of the spirochetes. *Journal of Bacteriology*, 173, 19: 6101-6109

Picken M. M., Picken R. M., Han D., Cheng Y., Strle F. 1996. Single-tube nested polymerase chain reaction assay based on flagellin gene sequences for detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 15: 489-498

Picken R. N., Strle F., Picken M. M., Ružič-Sabljić E., Maraspin V., Lotrič-Furlan S., Cimperman J. 1998. Identification of three species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, and *B. afzelii*) among isolates from acrodermatitis chronica atrophicans lesions. *Journal of Investigative Dermatology*, 110: 211–214

Picken R. N., Strle F., Ružič-Sabljić E., Maraspin V., Lotrič-Furlan S., Cimperman J., Cheng Y., Picken M. M. 1997. Molecular subtyping of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates from five patients with solitary lymphocytoma. *Journal of Investigative Dermatology*, 108: 92-97

Piesman J., Maupin G. O., Campos E. G., Happ C. M. 1991. Duration of adult female *Ixodes dammini* attachment and transmission of *Borrelia burgdorferi*, with description of a needle aspiration isolation method. *Journal of Infectious Diseases*, 163, 4: 895-897

Pohl-Koppe A., Wilske B., Weiss M., Schmidt H. 1998. *Borrelia* lymphocytoma in childhood. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 17: 423–426

Poljak M., Avšič-Županc T., Seme K. 1994. Verižna reakcija s polimerazo – nova raziskovalna in diagnostična metoda v virologiji. *Medicinski razgledi*, 33: 379-400

Postic D., Assous M. V., Grimont P. A. D., Baranton G. 1994. Diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato evidenced by restriction fragment length polymorphism of *rrf* (5S) - *rrl* (23S) intergenic spacer amplicons. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44, 4: 743–752

Postic D., Assous M., Belfaiza J., Baranton G. 1996. Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* of Lyme borreliosis. *Wiener klinische Wochenschrift*, 108, 23: 748-751

Postic D., Merien F., Perolat P., Baranton G. 2000. Biological diagnosis *Leptospiriosis-Lyme borreliosis*. Paris, Institut Pasteur: 197-247

Preac-Mursic V., Wanner G., Reinhardt S., Wilske B., Busch U., Marget W. 1996. Formation and cultivation of *Borrelia burgdorferi* spheroplast-L-form variants. *Infection*, 24: 218–226

Preac-Mursic V., Weber K., Pfister H. W., Wilske B., Gross B., Baumann A., Procop J. 1989. Survival of *Borrelia burgdorferi* in antibioticly treated patients with Lyme borreliosis. *Infection*, 17, 6: 355–359

Preac-Mursic V., Wilske B., Schierz G. 1986. European *Borrelia burgdorferi* isolated from humans and ticks culture conditions and antibiotic susceptibility. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie, und Hygiene. Series A = Medical Microbiology, Infectious Diseases, Virology, Parasitology*, 263, 1-2: 112-118

Radolf J. D. 1994. Role of outer membrane architecture in immune evasion by *Treponema pallidum* and *Borrelia burgdorferi*. *Trends in Microbiology*, 2, 9: 307-311

Read S. J. 2001. Recovery efficiencies of nucleic acid extraction kits as measured by quantitative LightCycler™ PCR. *Journal of Clinical Pathology*, 54: 86-90

Richard H. 2005. Spirochetes and *Neisseria*. Columbia, University of South Carolina (5. apr.2006) <http://pathmicro.med.sc.edu:85/fox/spiro-neisseria.htm> (21.apr. 2007): 1 str.

Richter D., Schlee B. D., Allgöwer R., Matuschka F. R. 2004. Relationships of a novel Lyme disease spirochete, *Borrelia spielmani* sp. nov., with its hosts in central Europe. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 11: 6414-6419

Rosa P., Bono J., Elias A., Errett J., Kupko J., Stevenson B., Taylor G., Tilly K. 1998. Genetic studies in *Borrelia burgdorferi*. *Wiener klinische Wochenschrift*, 110, 24: 859–862

Ružič E., Preac-Mursic V., Strle F., Cimperman J. 1991. First isolation of *Borrelia burgdorferi* from the skin in Slovenia. *Therapy of Infectious Diseases*, 6, 3-4: 270-276

Ružič-Sabljić E. 2002. Borelije. V: *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo*. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 293-302

Ružič-Sabljić E. 2006. Značilnosti bakterij, ki povzročajo Lymsko boreliozo pri ljudeh. V: *Lymska boreliosa 2006*. Strle F. (ur.). Ljubljana, Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Klinični center: Društvo za boj proti lymški boreliozii – Združenje za infektologijo SZD: 15–21

Ružič-Sabljić E., Maraspin V., Lotrič-Furlan S., Jurca T., Logar M., Pikelj-Pečnik A., Strle F. 2002. Characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains isolated from human material in Slovenia. *Wiener klinische Wochenschrift*, 114: 544-550

Sadzine A., Barbour A. G. 1996. Experimental immunization against Lyme borreliosis with recombinant Osp proteins: an overview. *Infection*, 24, 2: 195-202

Saint Girons I., Norris S. J., Geobel U. B., Mayer J., Walker E. M., Zuerner R. 1992. Genome structure of spirochete. *Research in Microbiology*, 143: 615-621

Schachterle S. 2004. *Lyme disease V: Medical ecology*. Columbia, Mailman School of Public Health Columbia. (27.jul.2006)

http://www.medicalecology.org/diseases/lyme/lyme_disease.html (24.apr.2007): 1 str.

Schmidt B. L. 1997. PCR in laboratory diagnosis of human *Borrelia burgdorferi* infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 10, 1: 185-201

Schwan T. G., Burgdorfer W., Garon C. F. 1988. Changes in infectivity and plasmid profile of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, as a result of in vitro cultivation. *Infection and Immunity*, 56, 8: 1831–1836

Schwartz J. J., Gazumyan A., Schwartz I. 1992. rRNA gene organization in the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Journal of Bacteriology*, 174, 11: 3757–3765

Shapiro E. D., Gerber M. A. 2000. Lyme disease. *Clinical Infectious Disease*, 31, 2: 533–542

Sood S. K., Salzman M. B., Johnson B. J. B., Happ C. M., Feig K., Carmody L., Rubin L. G., Hilton E., Peisman J. 1997. Duration of tick attachment as a predictor of the risk of Lyme disease in an area in which Lyme disease is endemic. *Journal of Infectious Disease*, 175: 996-999

Sood S. K. 1999. Lyme disease. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 18: 913–925

Srivastava A. K., Schlessinger D. 1990. Mechanism and regulation of bacterial ribosomal RNA processing. *Annual Reviews of Microbiology*, 44: 105-129

Stanek G., Burger I., Hirsch A., Wewalka G., Radda A. 1986. *Borrelia* transfer by ticks during their life cycle. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie, und Hygiene. Series A = Medical Microbiology, Infectious Diseases, Virology, Parasitology*, 263, 1-2: 29-33

Stanek G., Strle F. 2003. Lyme borreliosis. *Lancet*, 362: 1639-1647

Steere A. C. 1989. Lyme disease. *New England Journal of Medicine*, 321, 9: 586-596

Steere A. C. 2000. Lyme disease. V: *Emerging infections*. Krause R. M. (eds.). New York, Academic Press: 219–238

Steere A. C. 2001. Lyme disease. *New England Journal of Medicine*, 345: 115–125

Steere A. C., Malawista S. E., Hardin J. A., Ruddy S., Askenase W., Andiman W. A. 1977. Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis. The enlarging clinical spectrum. *Annals of Internal Medicine*, 86: 685–698

Strle F. 1991. Kakšna je možnost, da po vbodu klopa dobimo lymško boreliozo? *Zdravstveni vestnik*, 60: 140-140

Strle F. 1999a. Lyme borreliosis in Slovenia. *Zentralblatt für Bakteriologie: International Journal of Medical Microbiology*, 289, 5-7: 643-652

Strle F. 1999b. Acrodermatitis chronica atrophicans. *Medicinski razgledi*, 38, 1: 85–92

Strle F. 1999c. Principles of the diagnosis and antibiotic treatment of Lyme borreliosis, Wiener klinische Wochenschrift, 111: 911–915

Strle F. 2000. Klinični vidiki diagnoze lymške borelioze. V: Lymška borelioza 2000: Zbornik predavanj. 2. slovensko posvetovanje o lymški boreliozi. Ljubljana, 17 – 18 nov., 2000. Strle F. (ur.). Ljubljana, Društvo za lymško boreliozo – Infektološka sekcija SZD: 161–163

Strle F. 2006. Klinična slika lymške borelioze. V: Lymška borelioza 2006. Strle F. (ur.). Ljubljana, Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Klinični center: Društvo za boj proti lymški boreliozi - Združenje za infektologijo SZD: 47-136

Strle F., Cheng Y., Cimperman J., Maraspin V., Lotric-Furlan S., Nelson J. A., Picken M. M., Ruzic-Sabljić E., Picken R. N. 1995b. Persistence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in resolved erythema migrans lesions. Clinical Infectious Disease, 21: 380–389

Strle F., Maraspin V., Lotric-Furlan S., Ruzic-Sabljić E., Cimperman J. 1996. Azithromycin and doxycycline for treatment of borrelia culture-positive erythema migrans. Infection, 24: 66–70

Strle F., Maraspin-Čarman V., Furlan-Lotrič S., Ružić-Sabljić E., Pleterški-Rigler D., Cimperman J. 1995a. Epidemiološke značilnosti lymške borelioze v Sloveniji. Zdravstveni vestnik, 64: 145–150

Tovornik D. 1973. O naravnih žariščih klopnega meningoencefalitisa v Sloveniji. V: Simpozij o klopnem encefalitisu. Lesničar J. (ur.). Celje, Slovensko zdravniško društvo: 23-29

van Dam A. P., Kuiper H., Vos K., Widjojokusumo A., de Jongh B. M., Spanjaard L., Ramselaar A. C., Kramer M. D., Dankert J. 1993. Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestations of Lyme borreliosis. Clinical Infectious Disease, 17, 4: 708–717

Wang G., van Dam A. P., Schwartz I., Dankert J. 1999. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: taxonomic, epidemiological and clinical implications. *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 4: 633-653

Wilske B., Fingerle V., Schulte-Spechtel U. 2007. Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 49, 1: 13-21

Wilske B., Preac-Mursic V., Goebel U. B., Graf B., Jauris S., Sautschek E., Schwab E., Zumstein G. 1993. An OspA serotyping system for *Borrelia burgdorferi* based on reactivity with monoclonal antibodies and OspA sequence analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 31, 2: 340-350

Wilske B., Preac-Mursic V., Schierz G., Kuhbeck R., Barbour A. G., Kraner M. 1988. Antigenic variability of *Borrelia burgdorferi*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 539: 126–143

Wittwer C. T., Fillmore G. C., Garling D. J. 1990. Minimizing the time required for DNA amplification by efficient heat transfer to small samples. *Analytical Biochemistry*, 189: 328-331

Wormser G. P., Nowakowski J., Nadelman R. B. 2002. Duration of treatment for Lyme borreliosis: time for a critical reappraisal. *Wiener klinische Wochenschrift*, 114: 613–615

Xu Y., Johnson R. C. 1995. Analysis and comparison of plasmid profiles of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 10: 2679-2685

Xu Y., Kodner C., Coleman L., Johnson R. C. 1996. Correlation of plasmids with infectivity of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto type strain B31. *Infection and Immunity*, 64, 9: 3870-3876

Zakovska A., Dendis M., Pejchalova K. 2000. Spirochaetes in *Aedes* species, *Culex pipiens pipiens* larvae and hibernating *Culex pipiens molestus* mosquitoes detected with dark field microscopy (DFM) and polymerase chain reaction (PCR) methods. *Biologia*, 55: 667-670

Zore A., Petrovec M., Prosenc K., Trilar T., Ružič-Sabljić E., Avšič-Županc T. 1999. Infection of small mammals with *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Slovenia as determined by polymerase chain reaction (PCR). Wiener klinische Wochenschrift, 22-23: 997-999

Zore A., Ruzic-Sabljić E., Maraspin V., Cimperman J., Lotric-Furlan S., Pikelj A., Jurca T., Logar M., Strle F. 2002. Sensitivity of culture and polymerase chain reaction for the etiologic diagnosis of erythema migrans. Wiener klinische Wochenschrift, 114, 13-14: 606-609

Zore A., Trilar T., Ružič-Sabljić E., Avšič-Županc T. 2006. Okuženost klopov in gostiteljev z bakterijami *Borrelia burgdorferi* sensu lato v Sloveniji. V: Lymska borelioza 2006. Strle F. (ur.). Ljubljana, Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Klinični center: Društvo za boj proti lymski boreliozi - Združenje za infektologijo SZD: 23–30

ZAHVALA

Zahvala pripada številnim, ki sem se jih tako ali drugače oklepala pri opravljanju mojega diplomskega dela.

Sprva bi se zahvalila svoji mentorici doc. dr. Evi Ružić-Sabljić, ki me je s svojim navdušenim, spodbudnim in sproščenim pristopom vedno uspešno vodila do naslednjega koraka. Vsekakor pa ji je uspelo približati »male« skrivnostnosti molekularnega dela.

Zahvaljujem se prof. dr. Katji Seme, ki ji je uspelo v tako kratkem času prebrati mojo diplomu in ji dati končno podobo.

Zahvaljujem se tudi vsem sodelavkam v Laboratoriju za diagnostiko borelioz in leptospiroze za vso dano toplino, veliko smeha in naklonjeno prijaznost.

Velika žlica hvaležnosti je namenjena moji delovni mentorici Tjaši Cerar, ki mi je velikokrat priskočila na pomoč in mi v vsem tem času s praktičnimi nasveti (npr. hitro shojeni kilometri po hodnikih inštituta) in iznajdljivostjo v laboratoriju uspela predstaviti lepoto raziskovalnega dela.

Nazadnje bi se rada zahvalila tudi staršem, ki so me spodbujali ob prehajanju vseh preprek, me vedno podpirali in mi pomagali do ključnih odgovorov na moji študijski makedamski poti.

Vedno z /za vami!

PRILOGA

Priloga A: Zbrani rezultati pomnoževanja odsekov DNA *B. burgdorferi* sensu lato s tremi različicami PCR, rezultati restrikcije PCR-pridelka in vrsta vzorca.

Št.	Št. izolata DNA	VRSTA VZORCA	Dvostopenjska vgnezdena PCR	Enostopenjska vgnezdena PCR	Restrikcija PCR-pridelka	PCR v realnem času
1	5	koža	pozitiven	pozitiven	<i>B. garinii</i>	pozitiven
2	51 (a, b)	kolenski punkt	pozitiven	pozitiven	<i>B. burgdorferi sensu stricto</i>	pozitiven
3	60	kolenski punkt	pozitiven	pozitiven	<i>B. afzelii</i>	pozitiven
4	62 (a, b)	koža	pozitiven	pozitiven	<i>B. afzelii</i>	pozitiven
5	64	koža	pozitiven	pozitiven	<i>B. afzelii</i> + <i>B. garinii</i>	pozitiven
6	65	kolenski punkt	pozitiven	pozitiven	<i>B. afzelii</i>	pozitiven
7	82	kolenski punkt	pozitiven	pozitiven	<i>B. garinii</i>	pozitiven
8	83	kolenski punkt	pozitiven	pozitiven	<i>B. afzelii</i>	pozitiven
9	120	koža	pozitiven	pozitiven	<i>B. afzelii</i>	pozitiven
10	130 (a, b)	kolenski punkt	pozitiven	pozitiven	<i>B. garinii</i>	pozitiven
11	3	likvor	negativen	negativen		negativen
12	4	likvor	negativen	negativen		negativen
13	6	likvor	negativen	negativen		negativen
14	8	koža	negativen	negativen		negativen
15	9	koža	negativen	negativen		negativen
16	11	kolenski punkt	negativen	negativen		negativen
17	12	likvor	negativen	negativen		negativen
18	13	likvor	negativen	negativen		negativen
19	16	likvor	negativen	negativen		negativen
20	17	likvor	negativen	negativen		negativen
21	18	likvor	negativen	negativen		negativen
22	19	likvor	negativen	negativen		negativen
23	20	likvor	negativen	negativen		negativen
24	21	likvor	negativen	negativen		negativen
25	25	likvor	negativen	negativen		negativen
26	26	očesna vodica	negativen	negativen		negativen
27	31	koža	negativen	negativen		negativen
28	32	likvor	negativen	negativen		negativen
29	35	likvor	negativen	negativen		negativen
30	37	likvor	negativen	negativen		negativen
31	39	koža	negativen	negativen		negativen
32	40	likvor	negativen	negativen		negativen
33	42	likvor	negativen	negativen		negativen
34	45	likvor	negativen	negativen		negativen
35	46	likvor	negativen	negativen		negativen
36	47	likvor	negativen	negativen		negativen
37	49	likvor	negativen	negativen		negativen
38	52	likvor	negativen	negativen		negativen
39	54	koža	negativen	negativen		negativen

Nadaljevanje Priloga A: Zbrani rezultati pomnoževanja odsekov DNA *B. burgdorferi* sensu lato s tremi različicami PCR, rezultati restrikcije PCR-pridelka in vrsta vzorca.

Št.	Št. izolata DNA	VRSTA VZORCA	Dvostopenjska vgnezdna PCR	Enostopenjska vgnezdna PCR	Restrikcija PCR-pridelka	PCR v realnem času
40	55	koža	negativen	negativen		negativen
41	56	kolenski punkt	negativen	negativen		negativen
42	57	kolenski punkt	negativen	negativen		negativen
43	59	koža	negativen	negativen		negativen
44	67	koža	negativen	negativen		negativen
45	68	likvor	negativen	negativen		negativen
46	69	likvor	negativen	negativen		negativen
47	70	likvor	negativen	negativen		negativen
48	72	kolenski punkt	negativen	negativen		negativen
49	73	kri	negativen	negativen		negativen
50	74	likvor	negativen	negativen		negativen
51	75	likvor	negativen	negativen		negativen
52	76	koža	negativen	negativen		negativen
53	77	koža	negativen	negativen		negativen
54	78	koža	negativen	negativen		negativen
55	79	koža	negativen	negativen		negativen
56	80	likvor	negativen	negativen		negativen
57	84	kri	negativen	negativen		negativen
58	87	likvor	negativen	negativen		negativen
59	88	kolenski punkt	negativen	negativen		negativen
60	90	likvor	negativen	negativen		negativen
61	91	likvor	negativen	negativen		negativen
62	93	likvor	negativen	negativen		negativen
63	101	likvor	negativen	negativen		negativen
64	104	likvor	negativen	negativen		negativen
65	105	koža	negativen	negativen		negativen
66	107	likvor	negativen	negativen		negativen
67	108	koža	negativen	negativen		negativen
68	112	likvor	negativen	negativen		negativen
69	113	likvor	negativen	negativen		negativen
70	114	likvor	negativen	negativen		negativen
71	116	likvor	negativen	negativen		negativen
72	117	likvor	negativen	negativen		negativen
73	122	likvor	negativen	negativen		negativen
74	123	koža	negativen	negativen		negativen
75	126	košček sinovijske membrane	negativen	negativen		negativen
76	128	očesna steklovina	negativen	negativen		negativen
77	15	koža	negativen	negativen		negativen
78	23	likvor	negativen	negativen		negativen
79	28	likvor	negativen	negativen		negativen
80	58	koža	negativen	negativen		negativen
81	66 (a)	koža	negativen	negativen		negativen
82	30	kolenski punkt	negativen	negativen		negativen

Nadaljevanje Priloga A: Zbrani rezultati pomnoževanja odsekov DNA *B. burgdorferi* sensu lato s tremi različicami PCR, rezultati restrikcije PCR-pridelka in vrsta vzorca.

Št.	Št. izolata DNA	VRSTA VZORCA	Dvostopenjska vgnezdna PCR	Enostopenjska vgnezdna PCR	Restrikcija PCR-pridelka	PCR v realnem času
83	33	kolenski punkt	negativen	negativen		negativen
84	34	kri	negativen	negativen		negativen
85	95	likvor	negativen	negativen		negativen
86	96	koža	negativen	negativen		negativen
87	119	likvor	negativen	negativen		negativen
88	129	kolenski punkt	negativen	negativen		negativen
89	24	koža	negativen	negativen		negativen
90	36	kolenski punkt	negativen	negativen		negativen
91	48	koža	negativen	negativen		negativen
92	50 (b)	kolenski punkt	negativen	negativen		negativen
93	94	kolenski punkt	negativen	negativen		negativen
94	97	likvor	negativen	negativen		negativen
95	102	kolenski punkt	negativen	negativen		negativen
96	110	koža	negativen	negativen		negativen
97	1	koža	pozitiven	pozitiven	<i>B. garinii</i>	negativen
98	86	kolenski punkt	pozitiven	pozitiven	/	negativen
99	103	kolenski punkt	pozitiven	pozitiven	<i>B. garinii</i>	negativen
100	121 (a, b, c)	kolenski punkt	pozitiven	pozitiven	<i>B. afzelii</i>	negativen
101	2	koža	pozitiven	negativen		pozitiven
102	63	koža	pozitiven	negativen		pozitiven
103	66 (b)	koža	pozitiven	negativen		pozitiven
104	99	koža	pozitiven	negativen		pozitiven
105	22	koža	negativen	pozitiven	<i>B. afzelii</i> + <i>B. garinii</i>	pozitiven
106	27	koža	negativen	pozitiven	<i>B. afzelii</i>	pozitiven
107	109	koža	negativen	pozitiven	/	pozitiven
108	14	kolenski punkt	pozitiven	negativen		negativen
109	29	koža	negativen	pozitiven	<i>B. afzelii</i> + <i>B. garinii</i>	negativen
110	41	koža	negativen	pozitiven	<i>B. afzelii</i>	negativen
111	43	kolenski punkt	negativen	pozitiven	<i>B. afzelii</i> + <i>B. garinii</i>	negativen
112	44	koža	negativen	pozitiven	/	negativen
113	50 (a)	kolenski punkt	negativen	pozitiven	/	negativen
114	53	likvor	negativen	pozitiven	/	negativen
115	71	kolenski punkt	negativen	pozitiven	/	negativen
116	81	kolenski punkt	negativen	pozitiven	<i>B. afzelii</i> + <i>B. garinii</i>	negativen
117	89	kolenski punkt	negativen	pozitiven	/	negativen
118	92	kri	negativen	pozitiven	/	negativen
119	111	kolenski punkt	negativen	pozitiven	<i>B. afzelii</i>	negativen
120	115	koža	negativen	pozitiven	<i>B. afzelii</i>	negativen
121	124	koža	negativen	pozitiven	/	negativen
122	131	kolenski punkt	negativen	pozitiven	/	negativen

Nadaljevanje Priloga A: Zbrani rezultati pomnoževanja odsekov DNA *B. burgdorferi* sensu lato s tremi različicami PCR, rezultati restrikcije PCR-pridelka in vrsta vzorca.

Št.	Št. izolata DNA	VRSTA VZORCA	Dvostopenjska vgnezdna PCR	Enostopenjska vgnezdna PCR	Restrikcija PCR-pridelka	PCR v realnem času
123	132	kolenski punktati	negativen	pozitiven	/	negativen
124	133	kolenski punktati	negativen	pozitiven	/	negativen
125	118	kolenski punktati	negativen	pozitiven	/	negativen
126	7	likvor	negativen	negativen		pozitiven
127	10	koža	negativen	negativen		pozitiven
128	38	koža	negativen	negativen		pozitiven
129	61	koža	negativen	negativen		pozitiven
130	85	likvor	negativen	negativen		pozitiven
131	98	kri	negativen	negativen		pozitiven
132	100	likvor	negativen	negativen		pozitiven
133	106	likvor	negativen	negativen		pozitiven
134	125	kolenski punktati	negativen	negativen		pozitiven
135	127	likvor	negativen	negativen		pozitiven